

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

IAGO HENRIQUE SILVA MALTA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO E LASER NA
OSTEOARTRITE E A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS NA
NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS**

Alfenas/MG

2019

IAGO HENRIQUE SILVA MALTA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO E LASER NA
OSTEOARTRITE E A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS NA
NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

Orientador: Professor Doutor Giovane Galdino de Souza

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Malta, Iago Henrique Silva.
M261i Investigação dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser na osteoartrite
e a participação das células da glia espinais na nocicepção em camundongos.
/ Iago Henrique Silva Malta – Alfenas/MG, 2019.
108 f.: il. –

Orientador: Giovane Galdino de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Osteoartrite. 2. Dor. 3. Ultrassom. 4. Lasers. 5. Neuroglia. I. Souza,
Giovane Galdino de. II. Título.

CDD-612.88

IAGO HENRIQUE SILVA MALTA

“INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE RECURSOS FISIOTERAPÊUTICOS NA DOR
INDUZIDA PELA OSTEOARTRITE EM CAMUDONGOS”.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de
Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Aprovado em: 27/02/19

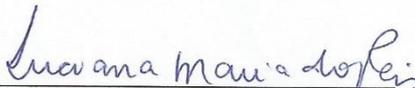
Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Luciana Maria dos Reis
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Dedico aos meus amados pais e à mulher da minha vida, Suellen.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao meu orientador, professor doutor Giovane Galdino de Souza, por ter aceitado inicialmente me receber sob sua orientação e por me ajudar a trilhar o caminho da pesquisa.

Infinitos agradecimentos eu ofereço principalmente ao amor da minha vida, Suellen de Azevedo Moreira. Minha companheira que, nos momentos mais difíceis da minha ainda curta caminhada nessa Terra, esteve inexoravelmente ao meu lado para me amparar. Foi o farol que guiou os meus passos quando divagaram em momentos incertos, e também a presença com quem compartilhei os meus momentos mais felizes. A ela, minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Cláudia e José Lúcio, os quais, cada um da sua forma, me apoiaram e incentivaram para que eu buscasse os meus objetivos. Devo a eles agradecer pelo que tenho na minha vida, e tudo o que eu construir vai ser devido ao amor e suporte que eles me ofereceram.

Devo agradecimentos também aos meus amigos de laboratório que, diariamente, compartilharam comigo pequenos sucessos e fracassos, e sem os quais pouco do que completei seria possível. Sinceros agradecimentos às minhas amigas Thamyris, Livia, Rafaela e ao meu colega Gusthavo, que me acompanharam nessa jornada.

Gostaria também de direcionar agradecimentos à instituição que me acolheu, desde a minha graduação, e que até hoje me mantém na busca de conhecimento. Obrigado à Universidade Federal de Alfenas e a todos os seus funcionários, especialmente a Luciana e o Luiz, os quais sempre estiveram à disposição para ajudar.

Por fim, agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A osteoartrite (OA) é um distúrbio musculoesquelético que acomete as articulações e, das doenças articulares, ela é a mais prevalente. A OA é multifatorial e apresenta como sintoma mais recorrente a dor. Sabe-se que, além da patologia articular, mecanismos centrais contribuem para intensificar a dor em pacientes com OA. As células da glia medulares têm sido investigadas na OA, e têm um papel importante na nocicepção induzida pela OA. Os recursos fisioterapêuticos, como o ultrassom terapêutico (US) e a laserterapia (LASER), têm sido amplamente utilizados na prática clínica porque apresentam efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em diversos distúrbios, incluindo a OA, e apresentam a vantagem de quase não apresentarem efeitos adversos. Sendo assim, o objetivo do estudo foi investigar o efeito do US e do LASER na nocicepção induzida pela OA e avaliar a participação das células da glia na nocicepção por meio de ensaios farmacológicos em camundongos. Foram utilizados camundongos machos *Swiss*, pesando entre 35 a 45 g. Para a indução de OA, os animais foram submetidos a uma única injeção intra-articular (i.a.) de 3,4 mg/Kg de iodoacetato monossódico (MIA). O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de *von frey* filamentos no período de 21 dias. Parâmetros clínicos de marcha, temperatura e diâmetro articular também foram avaliados. A participação da micróglia e astrócitos espinais na nocicepção induzida pela OA foi avaliada. Para isso, animais com OA e controle foram receberem uma injeção por via intratecal (i.t.) no 14º dia de minociclina (inibidor microglial) ou fluorocitrato (inibidor de astrócitos) nas doses de 0,001 mg/Kg e 0,002 mg/Kg de minociclina ou 5 nmol/Kg e 10 nmol/Kg de fluorocitrato. Além disso, animais com OA e controle foram tratados diariamente ao longo de 21 dias com US (1 MHz, 1 W/cm², contínuo, 5 minutos) ou LASER (830 nm, contínuo, 2 pontos de 8 J/cm²). A duração da antinocicepção de um único tratamento com US ou LASER no 14º dia também foi avaliada. Foi verificado que a injeção i.a. de MIA promoveu nocicepção a partir do terceiro dia até o 21º dia em relação ao grupo controle. A injeção i.t. tanto de minociclina como de fluorocitrato reverteu a nocicepção induzida pela OA, sugerindo a participação das células da glia espinais na nocicepção. O tratamento diário com US atenuou a nocicepção induzida pela OA do 14º ao 21º dia de tratamento, enquanto com o LASER atenuou no 3º, 10º e 14º dias de avaliação. O tratamento único com US ou LASER no 14º dia teve efeito antinociceptivo que durou uma hora após a aplicação. Não foram observadas diferenças na temperatura e diâmetro articular ao longo do experimento, assim como não houve alterações significativas de marcha. De acordo com os resultados, conclui-se que a OA promove nocicepção e ativação glial. Os recursos fisioterapêuticos promoveram antinocicepção quando aplicados diariamente e o presente modelo nociceptivo não causou alterações da marcha ou da temperatura e diâmetro articular.

Palavras-chave: Osteoartrite. Nocicepção. Ultrassom. Laser. Glia

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a musculoskeletal disorder that affects the joints and is the most prevalent of the joint diseases. OA is multifactorial and the most common pain symptom is pain. It is known that, in addition to joint pathology, central mechanisms contribute to intensify pain in patients with OA. Spinal glial cells have been investigated in OA, and they play an important role in OA-induced nociception. Physiotherapeutic resources, such as therapeutic ultrasound (US) and laser therapy (LASER), have been widely used in clinical practice because they produce anti-inflammatory and antinociceptive effects in several disorders, including OA, and are almost free of adverse effects. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of US and LASER on OA-induced nociception and also to assess the participation of glial cells in the nociception through pharmacological experiments in mice. Male Swiss mice weighing between 35 and 45 g were used. For the induction of OA, they received a single intra-articular (i.a.) injection of 3.4 mg/Kg of monosodium iodoacetate (MIA). The mechanical nociceptive threshold was evaluated by the von Frey filaments test for 21 days. Clinical parameters of gait, temperature and articular diameter were also evaluated. The participation of microglia and spinal astrocytes in OA-induced nociception was evaluated. For this, animals with OA and control animals were injected intrathecally (i.t.) on the 14th day with minocycline (a microglial inhibitor) or fluorocitrate (an astrocyte inhibitor) at the doses of 0.001 mg/Kg and 0.002 mg/Kg of minocycline or 5 nmol/Kg and 10 nmol/Kg of fluorocitrate. In addition, animals with OA and control animals were treated daily over 21 days with either US (1 MHz, 1 W/cm², continuous, 5 minutes) or LASER (830 nm, continuous, 2 points of 8 J/cm²). The duration of the effects of a single treatment with US or LASER on the 14th day was also evaluated. It was verified that the i.a. injection of MIA caused nociception from the third day until the 21st day compared to the control group. The i.t. injection of both of minocycline and fluorocitrate reversed the OA-induced nociception, suggesting that spinal glial cells participate in the nociception. Daily treatment with US attenuated the OA-induced nociception from the 14th to the 21st day of treatment, while LASER attenuated nociception in the 3rd, 10th and 14th day of evaluation. Single treatment with US or LASER on the 14th day had an antinociceptive effect that lasted for one hour after the application. No differences in joint temperature and diameter were observed during the experiment, nor were there any significant changes in gait. According to the results, we conclude that OA causes nociception and glial activation, the physiotherapeutic agents promoted antinociception when applied daily, and the present nociceptive model did not cause any changes in gait or joint temperature and diameter.

Key-words: Osteoarthritis. Nociception. Ultrasound. Laser. Glia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	imagem esquemática representando os efeitos térmicos e não térmicos do ultrassom, similares com os que acontecem nos fluidos teciduais	21
Figura 2 -	mecanismo de ação da FBM próxima do infravermelho por meio da sinalização mitocondrial retrógrada.....	28
Figura 3 -	representação dos tipos de fibras aferentes periféricas, incluindo os nociceptores, e os tipos de estímulos que as ativam	32
Figura 4 -	representação da via nociceptiva	34
Figura 5 -	injeção i.a. de MIA ou salina	44
Figura 6 -	imagem termográfica demonstrando o posicionamento do animal no momento da obtenção da imagem e a área de avaliação da temperatura articular	47
Figura 7 -	representação da marcação dos pontos de referência e dos ângulos articulares através do <i>software</i> Kinovea	49
Figura 8 -	cálculo da área plantar da pata direita do animal.....	49
Figura 9 -	tratamento com ultrassom subaquático.....	51
Figura 10 -	representação do tratamento com LASER.....	52
Figura 11 -	Experimento 1: avaliação do limiar nociceptivo de animais que receberam MIA ou salina i.a. ao longo de 21 dias.....	54
Figura 12 -	Experimento 2: avaliação do limiar nociceptivo mecânico, marcha, temperatura e diâmetro articular de animais que receberam MIA ou salina i.a., tratados diariamente por 21 dias com US ou LASER	55
Figura 13 -	Experimento 3: avaliação do limiar nociceptivo mecânico de animais que receberam MIA ou salina i.a. e receberam um único tratamento com US ou LASER no 14º dia após a injeção.....	56
Figura 14 -	Experimento 4: avaliação do limiar nociceptivo mecânico de animais que receberam aplicação i.a. de MIA ou salina, tratados com a injeção i.t. de minociclina ou fluorocitrato	57
Figura 15 -	imagens histológicas da articulação posterior direita dos animais obtidas por meio de microscopia (20x).....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	avaliação da nocicepção associada à OA induzida por MIA	58
Gráfico 2 -	avaliação do efeito antinociceptivo do tratamento com o US na nocicepção associada à OA induzida por MIA	60
Gráfico 3 -	avaliação do efeito antinociceptivo do tratamento com o LASER na nocicepção associada à OA induzida por MIA	61
Gráfico 4 -	avaliação da duração do efeito antinociceptivo de um único tratamento com US ou LASER na nocicepção associada à osteoartrite induzida por MIA	62
Gráfico 5 -	avaliação da temperatura articular do joelho direito dos animais e a influência do tratamento com US ou LASER na temperatura articular, obtida por meio de termografia.....	64
Gráfico 6 -	avaliação do diâmetro articular do joelho direito dos animais e a influência do tratamento com US ou LASER no diâmetro articular, obtida por meio de paquimetria.....	65
Gráfico 7 -	avaliação dos ângulos articulares do joelho do membro posterior direito, obtida por meio da análise da marcha capturada em vídeo	66
Gráfico 8 -	avaliação da área plantar da pata posterior direita dos animais, obtida por meio da análise da marcha capturada em vídeo.....	67
Gráfico 9 -	avaliação do envolvimento da micróglia espinal na nocicepção associada à osteoartrite induzida por MIA	70
Gráfico 10 -	avaliação do envolvimento dos astrócitos espinais na nocicepção associada à OA induzida por MIA	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°	Graus
°C	Graus Celsius
ADAMTS	Metaloproteinases com domínios de desintegrina e trombospondina
ADM	Amplitude de movimento
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATM	Articulação temporomandibular
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca²⁺	Cálcio
CCI	Constricção do nervo ciático
CCOx	Citocromo-C-oxidase
CDME	Corno dorsal da medula espinal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjunto completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
cm	Centímetros
cm²	Centímetros quadrados
COX	Cicloxygenase
DAMP	Padrões moleculares associados a dano
E.P.M	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERA	Área efetiva de radiação
FBM	Fotobiomodulação
Fluo	Fluorocitrato
g	Gramas
Ga-Al-as	Arseneto de gálio e alumínio
Ga-As	Arseneto de gálio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GRD	Gânglios da raiz dorsal
HE	Hematoxilina e eosina

He-Ne	Hélio-neônio
i.a.	Intra-articular
i.t.	Intratecal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
Iba1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IME	Intensidade média espacial
J	Joules
J/cm²	Joules por centímetro quadrado
LASER	Laserterapia
LCA	Ligamento cruzado anterior
LED	Diodo emissor de luz
LTBP	Laserterapia de baixa potência
m/s	Metros por segundo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
Mg²⁺	Magnésio
MIA	Iodoacetato monossódico
Mino	Minociclina
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase de matriz
mW	mili Watts
NF-κB	Fator nuclear κ B
ng	Nanograma
NK-1R	Receptor neurocinina do tipo 1
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OA	Osteoartrite
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE₂	Prostaglandina E ₂
pmol	Picomol
ROS	Espécies reativas de oxigênio

RRP	Receptores reconhecedores de padrão
SAL	Salina
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SNC	Sistema nervoso central
Sub P	Substância P
TENS	Estimulação elétrica transcutânea do nervo
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRL4	Receptor do tipo Toll 4
TRP	Receptor transiente de potencial
TRPV1	Receptor transiente de potencial vaniloide do tipo 1
TRPV4	Receptor transiente de potencial vaniloide do tipo 4
US	Ultrassom terapêutico
Vec	Veículo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
W	Watts
W/cm²	Watts por centímetro quadrado
μL	Microlitros
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	OSTEOARTRITE	15
2.2	TRATAMENTO DA OA.....	18
2.2.1	Ultrassom terapêutico.....	18
2.2.2	Laserterapia.....	24
2.3	DOR.....	30
2.3.1	Considerações gerais sobre a dor	30
2.3.2	A dor na OA.....	34
2.3.3	Sensibilização central e envolvimento glial na dor.....	37
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	ANIMAIS	43
4.2	MODELO DE OSTEOARTRITE	43
4.3	DROGAS	44
4.4	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	45
4.5	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO	45
4.6	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ARTICULAR	46
4.7	AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO ARTICULAR.....	47
4.8	AVALIAÇÃO DA MARCHA.....	47
4.9	APLICAÇÃO DOS RECURSOS FISIOTERAPÊUTICOS	50
4.9.1	Ultrassom terapêutico.....	50
4.9.2	LASER.....	51
4.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA	52
4.11	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	53
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS	58
5.1	AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE MIA	58

5.2	EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TRATAMENTO DIÁRIO COM US OU LASER NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA	59
5.3	EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UMA ÚNICA APLICAÇÃO DE US OU LASER NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA	61
5.4	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ARTICULAR NA OA E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM US OU LASER.....	63
5.5	AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO ARTICULAR DE JOELHO NA OA E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM US OU LASER.....	64
5.6	AVALIAÇÃO DA MARCHA DURANTE A OA E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM US OU LASER	65
5.7	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA OA E A INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE US E LASER	67
5.8	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA	68
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO	106

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é um distúrbio crônico e progressivo que acomete articulações sinoviais, causando deterioração da cartilagem articular e outros tecidos articulares, levando a comprometimentos funcionais e, principalmente, à dor articular, prejudicando o bem-estar e qualidade de vida dos indivíduos (PELLETIER et al., 2016).

Sinais e sintomas da OA são dor, redução da função, rigidez articular, instabilidade ou “falseamento” articular, deformidade articular, edema, crepitação articular e, dependendo da persistência da dor, acometimento psicológico. (HUNTER et al., 2009).

Apesar de a dor na OA ser resultante de uma série de eventos periféricos que levam à patologia articular, vários estudos têm atribuído a dor da OA também a mecanismos centrais (HUNTER et al., 2009; SAGAR et al., 2011; WOOLF, 2012), em que a via nociceptiva torna-se sensibilizada e a percepção da dor é amplificada.

As células da glia têm sido estudadas como estruturas cruciais envolvidas no processo de sensibilização central em casos de dor crônica, e a participação da micróglia e de astrócitos já foi demonstrada em modelos experimentais de OA (OGBONNA et al., 2013; OGBONNA; CLARK; MALCANGIO, 2015; SAGAR et al., 2011), destacando a importância da atividade dessas células na dor desencadeada pela OA.

Em distúrbios crônicos, como a OA, o aumento de impulsos nociceptivos na via nociceptiva pode levar à ativação de células da glia na medula espinal. Com a ativação dessas células, são liberados mediadores pró-inflamatórios que, atuando nos neurônios nociceptivos a nível central, alteram a excitabilidade da via nociceptiva, resultando em geração e transmissão amplificada de impulsos nociceptivos e percepção alterada de dor (MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Além dos recursos farmacológicos no tratamento da OA, os quais podem agregar efeitos adversos indesejados, terapias não farmacológicas também são utilizadas, como o ultrassom terapêutico (US) e a laserterapia (LASER). Além de serem seguros no tratamento da OA, esses recursos promovem um alívio significativo da dor (WITTENAUER; SMITH; ADEN, 2013; ZENG et al., 2015).

Vários estudos investigaram diferentes formas de influenciar, a nível espinal, a atividade das células da glia como forma de modular a dor. Tanto o US como o LASER são utilizados como forma de tratamento em modelos experimentais de OA, no entanto a literatura ainda traz poucos estudos demonstrando o efeito do tratamento com US e LASER na atividade de micróglia e astrócitos espinais e, conseqüentemente, o efeito antinociceptivo desses recursos por meio da modulação da atividade glial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma doença musculoesquelética caracterizada por lesões nas articulações sinoviais, mais comumente dos joelhos, quadris, mãos e coluna (ROSI; MASSABKI; KAIRALLA, 2010). Trata-se de um distúrbio crônico, e, portanto, insidioso e progressivo, que leva a alterações nas estruturas articulares. Uma articulação com OA pode apresentar áreas focais de perda de cartilagem articular, esclerose do osso subcondral e comprometimento de estruturas envolvidas na articulação, incluindo o tecido sinovial, ligamentos, componentes neuromusculares e cápsula articular (PEREIRA et al., 2011; ROSI; MASSABKI; KAIRALLA, 2010).

Como um distúrbio complexo, a OA não é apenas um processo único, mas um conjunto de sinais clínicos e patológicos resultantes de falhas estruturais de uma ou mais articulações sinoviais, normalmente apresentando sintomatologia (NUKI, 1999). Devido ao fato de o *turnover* de colágeno na matriz extracelular da cartilagem, ou seja, a quebra e reposição desse colágeno, ser substancialmente lento, uma eventual lesão articular com dano da cartilagem torna-se um severo agravante que pode levar ao processo de falha da articulação (EYRE, 2004). Em outras palavras, se a homeostase entre o reparo e o desarranjo articular for afetada, a capacidade de reparo articular pode ser sobrepujada, dando lugar à gênese do processo da OA.

De uma forma geral, a OA tem sido classificada simplesmente como primária ou secundária. Por um lado, a forma primária da OA, também conhecida como

idiopática, ocorre quando não há uma causa óbvia que leve à predisposição de desenvolver OA (NUKI, 1999). Atribui-se a OA primária também ao processo do envelhecimento (WITTENAUER; SMITH; ADEN, 2013), embora os fatores que caracterizam a OA secundária também tenham relação com a idade. Por outro lado, a OA secundária normalmente envolve a presença de um ou mais fatores de risco bem definidos, que desencadeiam o processo da OA (NUKI, 1999; WITTENAUER; SMITH; ADEN, 2013). Embora essa classificação tenha sido amplamente utilizada e aceita, há autores que não a consideram significativa, uma vez que, na sua concepção, a OA é sempre secundária a uma outra causa (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009).

Uma série de fatores de risco pode contribuir para o desenvolvimento da OA. Esses fatores podem ser relacionados às características do indivíduo ou inerentes à articulação comprometida (BARNES; EDWARDS, 2005; JOHNSON; HUNTER, 2014). Destacam-se como características do indivíduo que podem predispor à ocorrência da OA: fatores genéticos, idade, sexo, obesidade e dieta. Em relação à articulação, os fatores que podem predispor ao surgimento ou progressão da OA são: atividades físicas repetitivas e relacionadas à ocupação, lesões articulares pós-traumáticas, excesso de peso, fraqueza muscular, e alinhamento ou morfologia articular que provoque distribuição alterada de carga na mesma (BARNES; EDWARDS, 2005; JOHNSON; HUNTER, 2014; NEOGI; ZHANG, 2013).

Considerando dados epidemiológicos, no grupo das doenças musculoesqueléticas que acometem as articulações, a OA é a mais prevalente (JOHNSON; HUNTER, 2014; PEREIRA et al., 2011). De acordo com o estudo de Johnson (JOHNSON; HUNTER, 2014), a OA chega a afetar 15% da população adulta e lidera as causas de deficiências funcionais nos membros inferiores. De Rosis e colaboradores averiguaram que 36,9% dos idosos avaliados no seu estudo com idade acima de 64 anos apresentaram diagnóstico de OA, sendo a maioria (70,9%) do sexo feminino (ROSIS; MASSABKI; KAIRALLA, 2010).

Um relatório de 2004 publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a OA como a maior causa de incapacidade em idosos, compreendendo aproximadamente 50% dos distúrbios musculoesqueléticos. Estima-se mundialmente que 9,6% dos homens e 18% das mulheres com mais de 60 anos apresentem OA sintomática (WITTENAUER; SMITH; ADEN, 2013). Sendo assim, a OA acarreta um impacto econômico significativo pelo uso de recursos de saúde, visto que indivíduos

com OA na maioria das vezes procuram consultas, necessitam de dispositivos de auxílio, medicamentos para controle da dor e, em casos mais avançados, intervenções cirúrgicas de protetização (WITTENAUER; SMITH; ADEN, 2013).

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Reumatologia destaca a OA como o distúrbio mais frequente a ser atendido nos ambulatórios de reumatologia, correspondendo de 30 a 40% dos atendimentos realizados. Ademais, dados da Previdência Social do Brasil atribuem à OA 7,5% dos casos de afastamento do trabalho e 6,2% dos casos em que há necessidade de aposentadoria precoce (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2017), revelando o impacto social e econômico que a OA pode ter.

O diagnóstico da OA normalmente leva em consideração os sinais clínicos e sintomas normalmente associados à doença e os achados nos exames diagnósticos por imagem, principalmente radiográficos (HUNTER et al., 2009; KEAN; KEAN; BUCHANAN, 2004). Os sinais e sintomas que caracterizam a OA são vários. A dor articular é o sintoma mais comum deles. Essa dor normalmente é associada à atividade ou ao movimento e, em casos mais avançados, ocorre em repouso. Além disso, ela normalmente é profunda, apresenta-se de forma difusa e tem início insidioso. Quando persistente, essa dor pode levar a estresse psicológico. Outros sinais apresentados pela OA são redução da funcionalidade do indivíduo, rigidez articular (principalmente após períodos de inatividade) e instabilidade articular.

Deformidades articulares, edema e crepitação também podem ser identificados na OA (HUNTER et al., 2009). A OA é mais facilmente diagnosticada em estágios mais avançados, quando os sinais e sintomas estão mais evidentes. Em estágios iniciais, a OA pode ser difícil de diagnosticar. Exames por imagem podem auxiliar no diagnóstico precoce da OA, sendo a ressonância magnética melhor que a radiografia nesses casos (PELLETIER et al., 2016), contudo nem sempre a ressonância é escolhida devido à sua menor acessibilidade devido ao fato de ser mais onerosa.

A radiografia é uma ferramenta diagnóstica bastante utilizada para auxiliar no diagnóstico da OA. A respeito dos achados radiográficos que oferecem indícios de OA, eles são: perda ou diminuição do espaço articular, aumento da densidade do osso subcondral (também conhecido como esclerose do osso subcondral), formação de osteófitos e presença de cistos no osso subcondral. Apesar de oferecer importantes informações sobre a situação articular, a radiografia é um recurso adjunto da avaliação clínica, sendo o exame clínico a etapa mais importante da avaliação (KEAN; KEAN;

BUCHANAN, 2004), uma vez que os achados radiográficos nem sempre correspondem à sintomatologia relatada e os sinais apresentados pelos pacientes (HEIDARI, 2011; HUNTER et al., 2009; KEAN; KEAN; BUCHANAN, 2004).

2.2 TRATAMENTO DA OA

De forma geral, o tratamento da OA pode ser dividido em farmacológico, não farmacológico e cirúrgico. A fisioterapia enquadra-se na modalidade não farmacológica de tratamento da OA. O foco da atuação fisioterapêutica é a manutenção do quadro clínico estável do paciente e melhora da função, reduzindo ao máximo a quantidade de efeitos adversos dos tratamentos farmacológicos ou cirúrgicos para o indivíduo. Comumente, a intervenção não farmacológica é associada à farmacológica, reduzindo assim a quantidade necessária de drogas para o controle da dor, e assim a toxicidade causada por elas (BARNES; EDWARDS, 2005). Para alcançar esse objetivo, a fisioterapia deve se preocupar em reduzir a fraqueza muscular, promover melhora da amplitude de movimento, melhorar a marcha, o desempenho nas atividades de vida diária e, principalmente, reduzir a dor (BARNES; EDWARDS, 2005; COIMBRA et al., 2002).

A cinesioterapia é a principal ferramenta fisioterapêutica no tratamento da OA. Entretanto, outros recursos estão à disposição do fisioterapeuta, e são utilizados de forma adjunta no controle da patologia, auxiliando no tratamento e otimizando os resultados. Recursos como ultrassom terapêutico, laser e outros recursos fisioterapêuticos, tais como a estimulação elétrica transcutânea do nervo (TENS) e outras formas de eletroestimulação, têm sido amplamente utilizados na literatura para tratamento da OA, demonstrando resultados positivos, além de oferecer a vantagem de serem técnicas não invasivas que geram poucos efeitos adversos para o indivíduo.

2.2.1 Ultrassom terapêutico

O ultrassom terapêutico (US) é um dos recursos utilizados pela fisioterapia no tratamento da OA. O US consiste na aplicação de ondas sonoras nos tecidos, provocando efeitos térmicos e não térmicos (BAKER, 2001; ZENG et al., 2014).

A utilização médica do ultrassom começou a ser explorada em meados de 1930, inicialmente com o objetivo de aquecimento tecidual. Por volta de 1950, a aplicação não focalizada do ultrassom foi fundamentada, e em 1970 a técnica foi estabelecida para o uso na fisioterapia (MILLER et al., 2012). Entretanto, desde então, tanto o ultrassom diagnóstico como o terapêutico apresentaram desenvolvimento significativos. Atualmente, a modalidade terapêutica do ultrassom pode ser utilizada como terapia de uma vasta gama de condições clínicas, incluindo ablação tecidual na terapia do câncer, alívio de glaucoma, consolidação de fraturas ósseas, distúrbios musculoesqueléticos e até problemas de cálculos renais. Adicionalmente, o ultrassom pode ser uma ferramenta para auxiliar cirurgias e também pode contribuir facilitando a administração de fármacos (IZADIFAR; BABYN; CHAPMAN, 2017; MILLER et al., 2012).

A modalidade terapêutica do ultrassom utilizado pela fisioterapia compreende um aparelho que é normalmente composto por uma unidade base gerando sinais elétricos que são enviados a um transdutor manipulável (MILLER et al., 2012). O transdutor tem um cristal de cerâmica piezelétrico, que converte o sinal elétrico em vibrações, as quais se propagam pela matéria. Comumente, é utilizado um meio acoplante que serve como interface entre o transdutor e o tecido, de modo a garantir a propagação das ondas sem que haja perda da energia mecânica por refração. Devido à alta impedância, o ar não é um bom condutor das ondas ultrassônicas, causando refração e podendo danificar o transdutor, que é frágil. A água, por sua vez, é um ótimo agente acoplante devido às suas propriedades acústicas, e além da água, géis à base de água também são comumente recomendados e utilizados na prática clínica (BAXTER, 2003).

A partir do momento em que as ondas do ultrassom adentram o corpo, o ultrassom promove efeitos físicos e biológicos que são normalmente caracterizados como térmicos ou não térmicos (BAKER, 2001).

Os efeitos térmicos, como o próprio nome denota, compreendem o aumento da temperatura tecidual como resultado da estimulação pelas ondas sonoras (figura 1). O calor gerado pelo ultrassom surge da absorção da energia ultrassônica pelo tecido de acordo com os parâmetros do feixe ultrassônico e da configuração de exposição

ao mesmo. O aquecimento do tecido pela energia ultrassônica depende também das características do tecido tratado, como o coeficiente de absorção, densidade tecidual, perfusão tecidual, etc (DALECKI, 2004). Tecidos com mais proteína absorvem melhor a energia oferecida pelo ultrassom, tendendo a aumentar mais a temperatura tecidual (JOHNS, 2002), enquanto a aplicação de ultrassom sobre células isoladas em cultura não aparenta ter um efeito térmico tão intenso (LOVE; KREMKAU, 1980). Efeitos atribuídos ao aquecimento tecidual provocado pelo ultrassom são o aumento da atividade metabólica celular, aumento do fluxo sanguíneo local, efeito analgésico sobre nervos e, adicionalmente, maior extensibilidade do colágeno (BAKER, 2001).

Em relação aos efeitos não térmicos do ultrassom, existe um grande esforço da comunidade científica para melhor compreendê-los, devido ao fato de esses efeitos serem mais imprevisíveis do que os efeitos térmicos. Enquanto os efeitos térmicos podem ser planejados, principalmente pelo uso de um feixe focalizado (MILLER et al., 2012), os efeitos não térmicos apresentam mais variabilidade e são diversos. Dentre os efeitos não térmicos causados pelo ultrassom terapêutico, os mais comumente citados são os efeitos de cavitação, formação de microbolhas em agentes de contraste e formação de correntes acústicas (BAKER, 2001; IZADIFAR; BABYN; CHAPMAN, 2017; MILLER et al., 2012) (figura 1), embora outros efeitos não térmicos relacionados a campos acústicos provocados pelo ultrassom também tenham sido relatados com menor frequência.

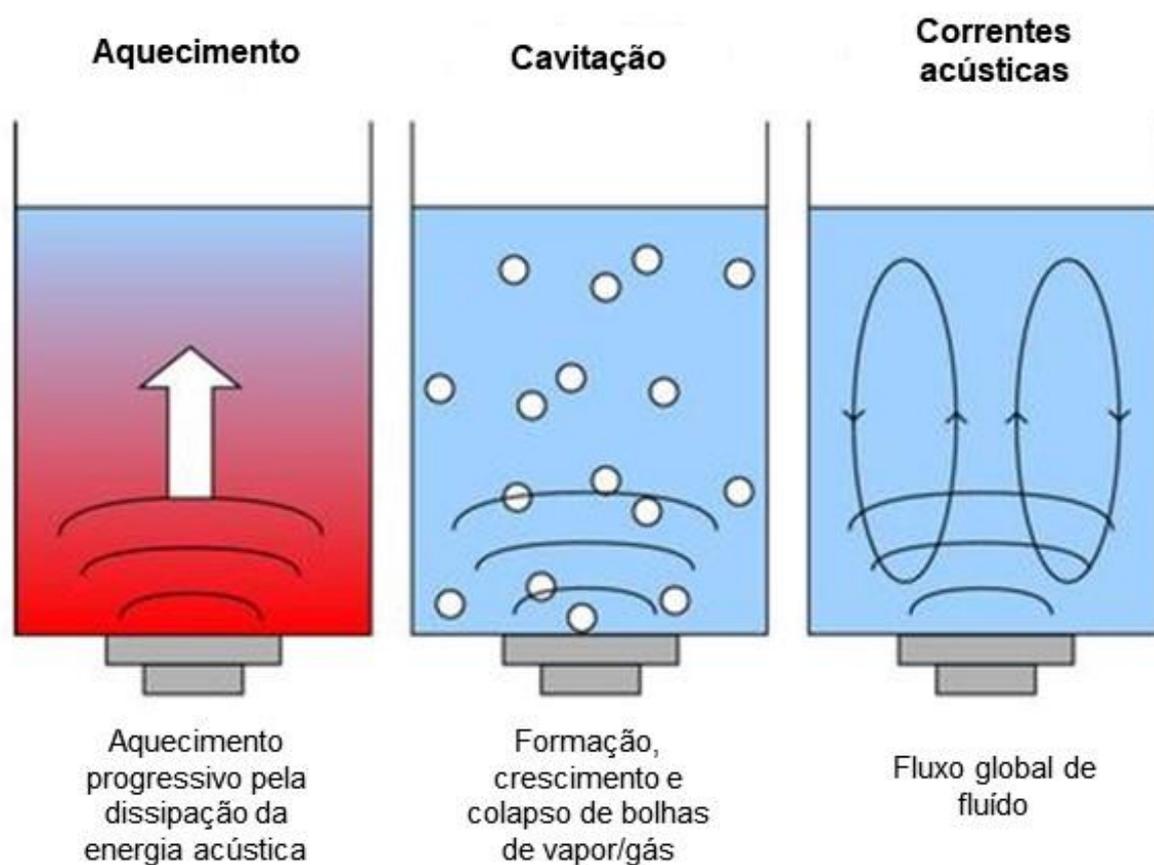


Figura 1 - imagem esquemática representando os efeitos térmicos e não térmicos do ultrassom, similares com os que acontecem nos fluidos teciduais.
 Fonte: adaptada de LEGAY e colaboradores (2011).

A cavitação é um dos efeitos não térmicos causados pelas vibrações rítmicas do ultrassom terapêutico. Basicamente, a cavitação é o resultado da interação do campo acústico com bolhas de gás. Dessa forma, é necessário a presença de um tecido ou fluido contendo gás estabilizado, e, com a propagação pelo tecido, ondas de rarefação podem iniciar a formação de bolhas nesses tecidos (DALECKI, 2004). Em outras palavras, essas ondas de rarefação reduzem a pressão no local, fazendo com que haja expansão e surgimento de microbolhas. A cavitação, seja ela inercial ou não inercial, promove efeitos biológicos que podem ser benéficos. A cavitação inercial ocorre quando há a formação de microbolhas, que permanecem oscilando e não colapsam violentamente. Esse efeito tem sido considerado benéfico para tratamento de tecidos lesados. No caso da cavitação não inercial, as microbolhas são formadas e implodem violentamente em curtos espaços de tempo, podendo causar danos às estruturas próximas (IZADIFAR; BABYN; CHAPMAN, 2017). De qualquer

forma, a cavitação provoca efeitos secundários nos tecidos que também serão discutidos.

Um desses efeitos secundários é a formação de correntes acústicas nos fluidos teciduais. Pode-se caracterizar correntes acústicas como uma alteração localizada no fluxo de fluidos em torno de bolhas oscilantes devido à propagação do campo acústico (BAKER, 2001). O movimento do fluido circundando uma microbolha oscilando no seu próprio eixo, ou os microjatos formados pelo colapso dessas bolhas, fazem parte do fenômeno de correntes acústicas. As correntes acústicas têm sido implicadas em métodos diagnósticos não invasivos (IZADIFAR; BABYN; CHAPMAN, 2017).

Além desses efeitos, outros efeitos secundários potenciais da terapia com ultrassom incluem a aplicação de forças compressivas, tensionais e estresse de cisalhamento sobre o tecido (MILLER et al., 2012), o que pode ser interessante no processo de remodelamento tecidual durante a regeneração. Entretanto, dependendo da intensidade da aplicação, essas forças podem se tornar insultos teciduais. Do ponto de vista da aplicação terapêutica dos efeitos do ultrassom acima descritos, Johns postula que os efeitos de cavitação e correntes acústicas inicialmente causam um retardo no crescimento celular, seguido de um aumento na síntese proteica, estimulando assim a recuperação celular (JOHNS, 2002).

Além dos efeitos não térmicos acima descritos, são vários os relatos na literatura de que o ultrassom tem a capacidade de influenciar a função imune e, conseqüentemente, a inflamação. Muitos dos estudos investigando os efeitos do ultrassom sobre a atividade das células imunes e na inflamação datam nas décadas de 80 e 90, em contraste com os estudos mais recentes envolvendo os demais efeitos não térmicos. Um estudo *in vitro* revelou que o ultrassom tem a capacidade de aumentar a adesão de leucócitos nas células endoteliais (MAXWELL et al., 1994), o que possivelmente pode estimular a passagem dessas células para o tecido alvo durante a inflamação *in vivo*. Além disso, Estudos *in vivo* em ratos demonstram que doses mais elevadas, no limite do espectro terapêutico do ultrassom, podem levar à degranulação de mastócitos na pele, o que não ocorre em doses terapêuticas menores (DYSON; LUKE, 1986). Foi visto também que a estimulação com ultrassom reduz a capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais de camundongos (ANDERSON; BARRETT, 1981).

Doan e colaboradores realizaram um estudo no qual foi avaliada a proliferação celular, síntese de proteínas e liberação de citocinas utilizando cultura celular de

osteoblastos maxilares, fibroblastos gengivais e monócitos periféricos. Os autores encontraram maior proliferação de osteoblastos e fibroblastos, maior síntese de colágeno e proteínas não colágenas, maior liberação da interleucina 1 β (IL-1 β) e também maior produção de fatores angiogênicos, como por exemplo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (DOAN et al., 1999). Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa confirmou o aumento da liberação de fatores angiogênicos pela estimulação com ultrassom, atribuindo também as características regenerativas do ultrassom à beneficiação do processo de angiogênese (REHER et al., 1999).

Johns, em sua revisão sobre os efeitos não térmicos do ultrassom, lista outros efeitos do ultrassom envolvendo a resposta inflamatória e a atividade de células imune, sendo esses o aumento nos níveis de diversos fatores de crescimento, migração e proliferação endotelial, crescimento de fibroblastos, crescimento de células T, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, entre outros (JOHNS, 2002). Sendo assim, a literatura traz um vasto leque de achados que apontam a capacidade do ultrassom terapêutico de modular a inflamação por meio da sua atuação sobre as células imunes.

Do ponto de vista fisioterapêutico, os resultados clínicos do tratamento com ultrassom também têm sido relatados. Uma meta-análise investigando o efeito do ultrassom no tratamento da dor lombar foi realizada. Apesar de alguns dos estudos analisados terem relatado melhoras na função de pessoas com dor lombar, não há evidência de alta qualidade o bastante para atestar claramente a eficácia do ultrassom no tratamento desse distúrbio (EBADI et al., 2014). Entretanto, o tratamento de outros distúrbios musculoesqueléticos com o ultrassom pode gerar resultados positivos, de acordo com relatos. Pacientes com síndrome da dor miofascial apresentam redução da dor, redução de espasmos musculares, melhora da qualidade de vida e melhora bem-estar psicológico de acordo com os questionários aplicados, principalmente os tratados com a modalidade contínua de ultrassom (ILTER et al., 2015). O ultrassom também foi considerado efetivo na redução de dor e melhora de função, além de ser um recurso seguro no tratamento de OA de joelhos, segundo uma meta-análise publicada em 2016 (ZHANG et al., 2016). Foi demonstrado também que o US contínuo e pulsado podem causar o alívio da dor, enquanto a melhora da função está mais relacionada com o US pulsado em casos de OA de joelhos e quadris (YEĞİN; ALTAN; KASAPOĞLU AKSOY, 2017; ZENG et al., 2014), corroborando com as considerações de uma meta-análise a respeito da efetividade do US no tratamento de OA (RUTJES

et al., 2010). Dessa forma, considerando as informações da literatura, o ultrassom pode ser um recurso auxiliar importante no tratamento não farmacológico da dor na OA.

Por meio dos efeitos já descritos promovidos pelo US, este recurso pode atuar direta e indiretamente na dor crônica por meio de diversos mecanismos. Além do aquecimento tecidual local, o US pode promover um efeito de micromassagem e melhorar a nutrição tecidual (ILTER et al., 2015). Além disso, no caso específico da OA, o US pode melhorar a extensibilidade dos tecidos articulares, como a cápsula, tendões e ligamentos, melhorar a permeabilidade capilar e fluxo sanguíneo local e até mesmo modular a dor pela ativação de fibras do tipo A α e A β (YEĞİN; ALTAN; KASAPOĞLU AKSOY, 2017).

Além dos efeitos periféricos já descritos, os efeitos centrais do tratamento com os recursos fisioterapêuticos têm sido investigados e descritos, embora exista poucos estudos que fornecem esses relatos. Dois estudos distintos conduzidos por Hsieh (HSIEH, 2005, 2008) encontraram resultados interessantes em relação à influência do US sobre a modulação da dor na medula espinal. Um deles verificou a ocorrência do aumento no número de neurônios expressando c-Fos, um gene considerado um marcador de ativação de neurônios nociceptivos no CDME. A ativação foi causada pela indução de OA no joelho de ratos utilizando-se adjuvante completo de Freund (CFA). Após a aplicação de US pulsado, houve redução da expressão do gene c-Fos no corno dorsal da medula na fase inicial de OA. No entanto, na fase tardia da doença, houve uma inversão dos achados, sendo identificado um aumento na expressão do mesmo gene (HSIEH, 2008). Outro estudo similar realizado por esse mesmo grupo investigou o número de neurônios que expressam óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela produção de NO, um neurotransmissor não clássico que participa da sinalização nociceptiva na medula espinal em resposta à dor inflamatória. Foi encontrado um aumento na expressão de NOS no CDME após a indução de OA em ratos pela injeção i.a. de CFA, e esse efeito foi inibido pela aplicação periférica de US (HSIEH, 2005). Esses achados sugerem que o US pode modular a nocicepção não somente na periferia, mas também a nível espinal.

2.2.2 Laserterapia

Um outro recurso que tem sido utilizado no tratamento não farmacológico da OA é o laser.

A palavra LASER representa um acrônimo do termo em inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (luz amplificada pela emissão estimulada de radiação). O laser, ou a luz concentrada emitida pelo aparelho gerador, é formado pela emissão estimulada de fótons. Uma lâmpada normal apresenta um material condutor que, ao ser estimulado (normalmente por eletricidade), faz com que os elétrons de seus átomos sejam excitados com a energia e saltem para uma camada de mais energia. Nesse novo estado, esses elétrons se tornam instáveis e, ao voltar para a camada eletrônica anterior, liberam o excesso de energia na forma de fótons de luz, cujo comprimento de onda será determinado pela diferença entre as bandas de valência. No laser, entretanto, existe um meio ativo que, ao ser bombeado por energia elétrica, libera fótons com determinada energia quântica capaz de estimular elétrons já excitados. Sendo assim, esses elétrons duplamente excitados liberam o excesso de energia na forma de múltiplos fótons, que são emitidos em sincronia (BAXTER, 2003).

Os meios ativos mais comuns em aparelhos de laser comerciais são a mistura de gases hélio-neônio (He-Ne), semicondutores de arseneto de gálio (Ga-As) ou semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs). Os lasers de He-Ne são da primeira geração e, portanto, são menos utilizados atualmente. O laser de He-Ne emite radiação no comprimento de onda de 632,8 nm, enquanto o Ga-As e GaAlAs produzem radiação na faixa de comprimento de onda de 630 a 950 nm. Além dos meios ativos, é necessária uma cavidade ressonante na qual o meio ativo pode ser contido e direcionado. Essa cavidade é composta internamente por espelhos, nos quais os feixes do laser refletem indefinidamente até deixarem a cavidade, saindo assim da ponteira ou caneta de aplicação (BAXTER, 2003).

O laser apresenta características importantes que o distinguem de outras fontes luminosas. São elas a monocromaticidade, colimação e coerência. Lasers são, na maioria das vezes, monocromáticos, o que significa que a luz emitida é de um comprimento de onda único, em contraste à luz emitida por uma lâmpada de iluminação, por exemplo, que emite comprimentos de onda distintos variando do violeta ao infravermelho. A colimação é uma propriedade que confere potência do feixe do laser, pois os fótons emitidos pelo aparelho quase não apresentam

divergência e caminham paralelamente, mantendo-se agrupados em uma pequena área. A coerência é uma propriedade específica do laser, a qual caracteriza-se pela manutenção da coerência temporal e espacial da luz emitida, isto é, a luz mantém-se numa única fase em que os picos e depressões nas ondas luminosas permanecem rigidamente alinhados (BAXTER, 2003). Essas características atribuem ao laser a sua especificidade na interação com os tecidos.

A aplicação clínica de terapias baseadas em luz é ampla, abrangendo terapias fotodinâmicas para tratamento de câncer, terapias ultravioleta usadas em tratamentos de doenças de pele e também a fotobiomodulação (FBM), utilizada para estimular o crescimento celular e recuperação de lesões (POYTON; BALL, 2011). A laserterapia de baixa potência (LTBP), comumente utilizada na prática clínica do fisioterapeuta, pode ser considerada uma forma de fotobiomodulação. No entanto, LTBT não é mais considerada o melhor termo para definir o tratamento com laser, uma vez que o termo derivado do inglês "*low level laser therapy*" foi julgado ser muito amplo e vago, e não exatamente aplicável às demais possíveis formas de terapia com luz, que incluem o uso de diodos emissores de luz (LEDs) e outras fontes de irradiação (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015). Sendo assim, o termo mais adequado seria fotobiomodulação, que pode ser definida como um tipo de terapia com luz que utiliza fontes de luz não ionizante como laser, LEDs e luz de banda larga, no espectro vermelho visível e próximo ao infravermelho, sendo uma terapia não térmica que promove efeitos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas por meio de cromóforos endógenos (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015). A FBM distingue-se das outras terapias baseadas em luz por não promover, normalmente, aquecimento tecidual devido à sua baixa potência. Difere-se da terapia fotodinâmica, por exemplo, pelo fato de não provocar ablação tecidual ou necessitar de cromóforos exógenos administrados previamente para promover seus efeitos. (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Como mencionado acima, a FBM proporcionada pelo tratamento com laser depende da estimulação de cromóforos endógenos para promover efeitos terapêuticos. Esses cromóforos são, essencialmente, moléculas ou estruturas celulares que são fotossensíveis, isto é, absorvem a radiação do laser e, em decorrência disso, sofrem alteração em suas funções. O principal cromóforo discutido na literatura é a enzima citocromo-C-oxidase (CCOx). Essa molécula funciona como um fotoceptor, sendo sensível a comprimentos de onda de luz vermelha ou próximo de infravermelho, na região de 620 nm a 820 nm (KARU, 2014). Outros complexos na

cadeia de transferência de elétrons também têm sua atividade aumentada, incluindo a succinato desidrogenase (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Sendo assim, os efeitos da FBM pela estimulação com laser têm origem principalmente em alterações mitocondriais. Reações primárias que seguem a bioestimulação principalmente da CCOx são: aceleração da transferência de elétrons, modulação da liberação de óxido nítrico (NO) nos centros catalíticos da CCOx e modulação redox com formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KARU, 2014). A partir desses eventos primários, outros efeitos secundários a nível celular e molecular são desencadeados. Um mecanismo que tem sido aceito para explicar a interação entre luz e célula é a chamada sinalização mitocondrial retrógrada.

De forma simplificada, a partir do momento em que o fotoceptor, nesse caso o cromóforo CCOx, é estimulado pela luz, há um aumento no potencial de membrana mitocondrial, levando a uma alteração na síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e liberação de ROS, além de alterações na concentração de Ca^{++} e NO. Essas modificações, associadas com alterações de pH e nos níveis de segundos mensageiros intracelulares, como o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), influenciam a sinalização entre a mitocôndria e o núcleo celular. Com a alteração na atividade de fatores de transcrição nucleares, a consequência dessa sinalização retrógrada partindo da mitocôndria ao núcleo é o aumento na taxa de síntese de RNA e expressão de genes de variadas categorias, levando à modulação de diversas funções celulares (KARU, 2008), que por sua vez serão mediadas por várias outras vias de sinalização, moléculas sinalizadoras e efetoras (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

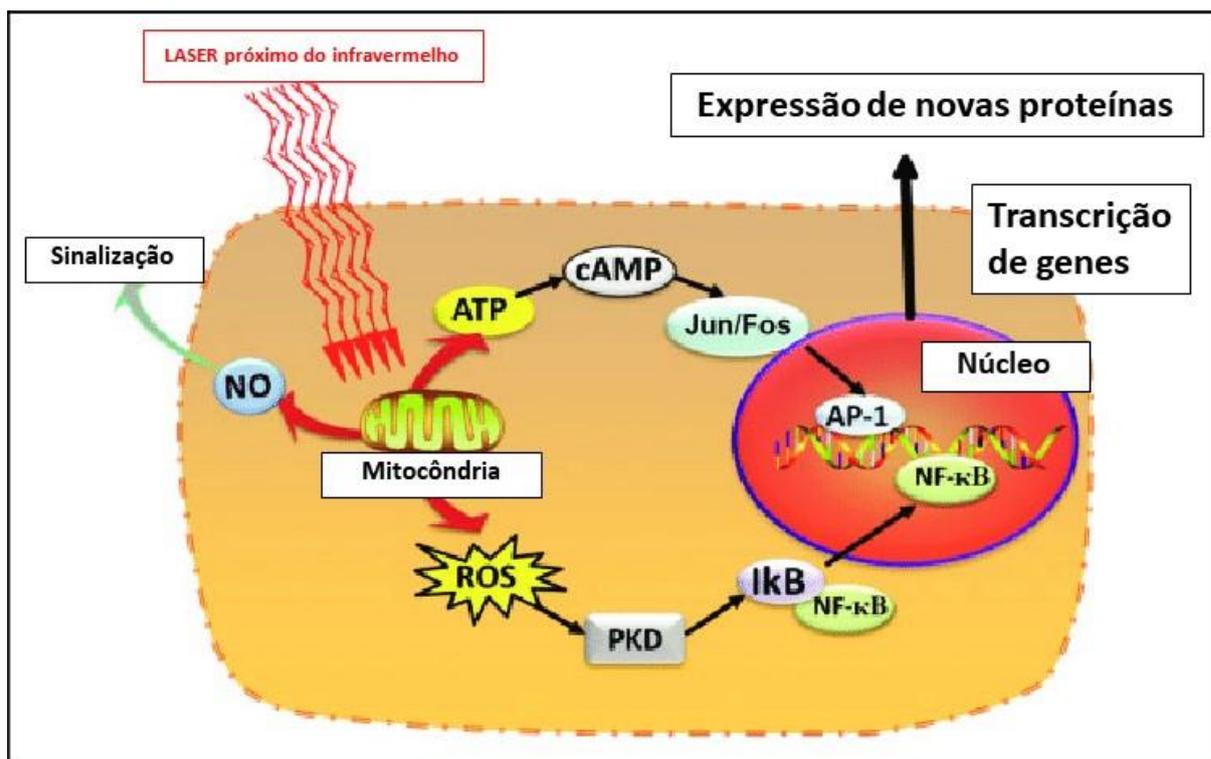


Figura 2 - mecanismo de ação da FBM próxima do infravermelho por meio da sinalização mitocondrial retrógrada.

Fonte: adaptada de Giordano e colaboradores (2017).

Além da interação com cromóforos e os efeitos advindos disso, a literatura aponta outros possíveis mecanismos de ação da FBM a nível celular. Canais iônicos do tipo receptor transiente de potencial (TRP) são moderadamente sensíveis à irradiação com LASER. Apesar das várias subfamílias desses canais, os que aparentam estar envolvidos com os efeitos da FBM são os receptores de potencial transiente vaniloide do tipo 1 e tipo 4 (TRPV1 e TRPV4). O TRPV1 e o TRPV4 são expressos na membrana plasmática das terminações nervosas de neurônios aferentes primários e têm uma função importante na transdução de estímulos nocivos e na percepção da dor, de uma forma geral. Normalmente, o TRPV1 é ativado por capsaicina (o componente pungente de algumas pimentas), e se torna sensibilizado por quedas no pH e temperaturas elevadas (ROSENBAUM; SIMON, 2007). O TRPV4, por sua vez, embora seja comumente relacionado com regulação osmótica e transdução de estímulos mecânicos, também desempenha um papel importante na sinalização inflamatória e de dor (KANJU et al., 2016).

Entretanto, foi visto que a fotobiomodulação pode influenciar a atividade de células imunes, como mastócitos e macrófagos, por meio da ativação ou supressão desses canais. Normalmente, comprimentos de onda próximo do verde (532 nm)

tendem a ativar tanto TRPV1 e TRPV4. Yang e colaboradores, por exemplo, demonstraram que a ativação de TRPV4 pelo laser de 532 nm promoveu liberação de histamina por mastócitos, acelerando o processo de regeneração da pele (YANG et al., 2007). Comprimentos de onda na região do infravermelho, entretanto, tendem a atenuar a ativação desses canais, promovendo efeitos antinociceptivos (FREITAS; HAMBLIN, 2016). Portanto, acredita-se que alguns canais iônicos podem ser influenciados pela FBM, alterando o funcionamento neuronal e, por conseguinte, promovendo efeitos terapêuticos.

A irradiação dos tecidos com laser provoca uma variedade de efeitos terapêuticos, de acordo com as características da radiação, incluindo efeitos térmicos na estimulação de alta potência, efeitos mecânicos, elétricos, fotoquímicos e bioestimuladores (ANGELOVA; ILIEVA, 2016). De uma forma geral, o laser tem sido utilizado para o tratamento de uma infinidade de distúrbios musculoesqueléticos, incluindo a OA. Estudos com laserterapia de alta potência demonstraram que ocorre principalmente redução da dor no tratamento da OA de joelhos (ANGELOVA; ILIEVA, 2016; STIGLIC-ROGOZNICA et al., 2011). Porém, resultados semelhantes também foram encontrados com a FBM. Um estudo envolvendo laserterapia de baixa potência associada a um programa de exercícios físicos demonstrou que houve redução da dor e melhora da capacidade funcional de indivíduos com OA de joelho (ALFREDO et al., 2012). Outro estudo relatou melhora no quadro de dor e funcionalidade a curto prazo na OA de joelhos após a aplicação de laser de baixa potência, em relação a um grupo controle (FUKUDA et al., 2011).

Na dor neuropática, por exemplo, tem sido demonstrado também que o LASER não modula apenas o processo inflamatório periférico, podendo adicionalmente promover alteração da excitabilidade e condução de neurônios periféricos, e ter influência supraespinal, com liberação de endorfinas a nível central (ANDRADE; BOSSINI; PARIZOTTO, 2016).

Em relação à FBM, há relatos na literatura que a aplicação de uma modalidade de laserterapia por meio de LED também pode ter participação na modulação nociceptiva na medula espinal. Cidral-Filho e colaboradores observaram que a expressão de fator de necrose tumoral α (TNF- α) no CDME foi reduzida após irradiação com LED, em um modelo de dor neuropática com o esmagamento do nervo ciático em camundongos *Swiss*. Entretanto a expressão de outras citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1 β e IL-10, respectivamente, não foi alterada (CIDRAL-FILHO

et al., 2013). Além disso, em um modelo de lesão por compressão da medula espinal de ratos, observou-se que o tratamento por 2 semanas com laser conseguiu atenuar a nocicepção provocada pela lesão, e também normalizar o aumento na expressão medular de IL-6 causada pela compressão (MOJARAD et al., 2018). Com isso, espera-se que a laserterapia também possa exercer influência nos mecanismos medulares de controle da nocicepção.

Dessa forma, o laser pode ser uma alternativa viável para controle da dor e melhora da funcionalidade na OA, embora haja uma grande variabilidade nos métodos utilizados e necessidade de melhor padronização na utilização da técnica para tratamento da OA.

2.3 DOR

2.3.1 Considerações gerais sobre a dor

A dor é um dos sintomas mais comuns na OA. Embora apenas 15% dos pacientes que apresentam OA sintomática de mão relatem dor, 50% dos pacientes que apresentam OA de joelho referem sentir dor, e nos pacientes com OA de quadril essa porcentagem é ainda maior (PELLETIER et al., 2016). Em vista disso, a dor é um fator importante a ser considerado na OA, levando em conta os impactos que ela pode ter na qualidade de vida do indivíduo.

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, que pode estar associada ao dano tecidual real ou potencial (MERSKEY; BOGDUK, 2012). Tal definição salienta que a dor tem uma conotação individual e depende de experiências prévias, levando em consideração a subjetividade do evento doloroso para o indivíduo (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

No entanto, a dor não deve ser confundida com nocicepção. A nocicepção caracteriza-se pelo processo neural de codificação e processamento de estímulo nocivos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010), e embora a nocicepção seja parte essencial do processo doloroso, ela se difere porque a dor agrega manifestações cognitivas e

emocionais ao evento nociceptivo. A dor, como uma sub-modalidade sensorial, tem uma função importante na proteção do organismo, servindo como sinal de alerta para estímulos nocivos. Dessa forma, a dor nos permite evitar situações potencialmente lesivas ao organismo, com o objetivo de preservar sua integridade.

Em condições normais, a dor ocorre quando algum estímulo nocivo, seja de natureza mecânica, térmica ou química, ativa receptores de alto limiar especializados, que realizam a transdução do estímulo potencialmente lesivo em informação nociceptiva por meio de potenciais de ação. Esses receptores estão presentes na superfície das terminações nervosas dos nociceptores que inervam os tecidos. Os nociceptores nada mais são que neurônios aferentes primários responsáveis pela captação de estímulos nocivos e transmissão das informações nociceptivas da periferia para o sistema nervoso central (SNC). Pelo fato de os nociceptores apresentarem essas terminações livres não especializadas, em contrapartida dos receptores especializados que detectam estímulos inócuos, eles são categorizados de acordo com as propriedades de seus axônios (PURVES, 2003). As fibras nervosas dos nociceptores, comparativamente às fibras puramente sensoriais, apresentam baixo calibre e menor mielinização. As fibras consideradas nociceptivas são as fibras do tipo A δ e do tipo C. As fibras A δ são mais calibrosas e apresentam uma delgada bainha de mielina, permitindo-lhe a transmissão do potencial de ação com velocidade de até 20 m/s. Essas fibras transmitem informações nociceptivas de estímulos mecânicos perigosamente intensos, além de estímulos mecânicos e térmicos não nociceptivos. As fibras do tipo C, por outro lado, são também conhecidas como fibras polimodais, pois transportam estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica e química (figura 3). A velocidade de condução das fibras do tipo C, no entanto, é menor em relação às fibras do tipo A δ , alcançando apenas velocidades de transmissão até 2 m/s, devido ao seu menor calibre e ausência de bainha de mielina (PURVES, 2003). Uma vez que o estímulo nocivo foi captado e transduzido, ele é transferido ao longo do axônio dos nociceptores até a medula espinal, onde será processado e enviado a centros supraespinais da via nociceptiva.

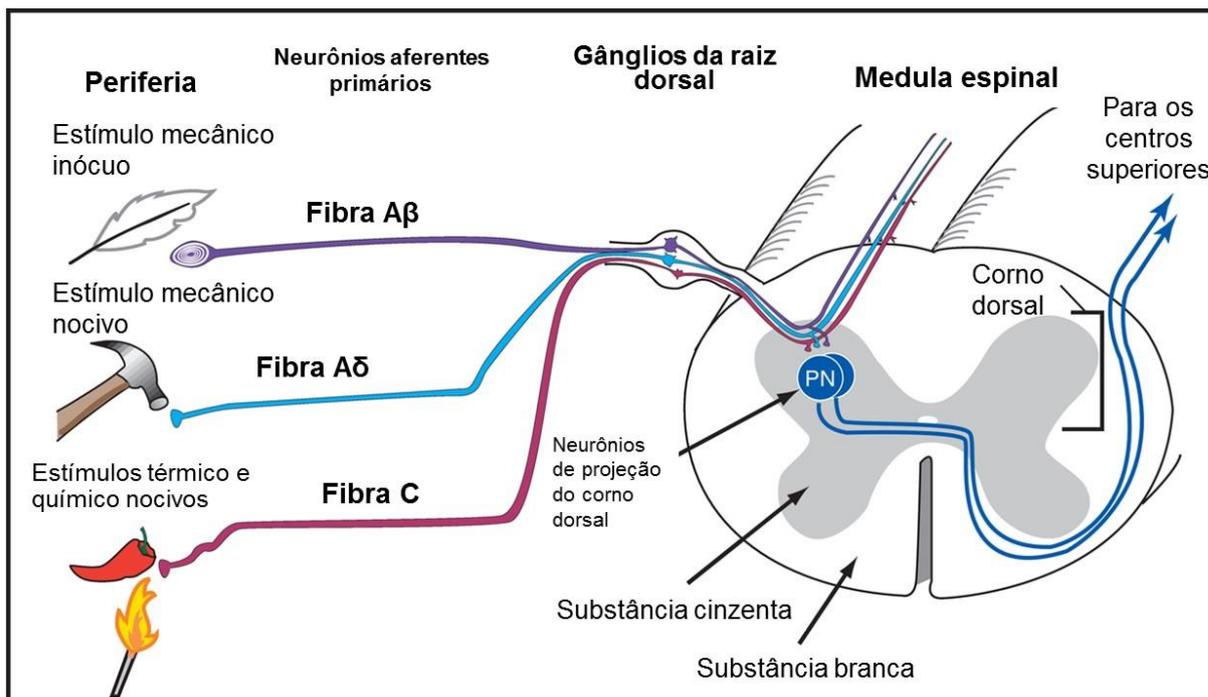


Figura 3 - representação dos tipos de fibras aferentes periféricas, incluindo os nociceptores, e os tipos de estímulos que as ativam.
 Fonte: adaptado de Stahl (2013).

As raízes dorsais das fibras A δ e C dos nociceptores chegam na medula espinal e adentram o corno dorsal da medula espinal (CDME), onde residem neurônios de projeção (ou neurônios aferentes de segunda ordem), interneurônios excitatórios e inibitórios e neurônios intersegmentares (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004) (figura 4). Nesse local, os nociceptores formam sinapses principalmente com subpopulações específicas de neurônios de projeção responsáveis pela nocicepção, localizadas principalmente nas lâminas I, II, V e VI do CDME. No caso dos nervos cranianos que captam informações sensoriais da cabeça e pescoço, os nociceptores transmitem os impulsos para núcleos localizado no tronco encefálico. A partir do momento em que os neurônios de projeção são excitados direta ou indiretamente pelos nociceptores periféricos, as informações nociceptivas são passadas adiante na via nociceptiva para os centros superiores de processamento. Os neurônios de projeção emitem seus axônios que ascendem em distintos tratos aferentes, sendo o principal trato para transmissão de impulsos nociceptivos o trato espinotalâmico. A maioria dos axônios dos neurônios do trato espinotalâmico decussam para o lado contralateral da medula espinal, onde ascendem principalmente pelo funículo anterolateral (neoespinotalâmico) e, em menor quantidade, pelo funículo posterolateral (paleoespinotalâmico), em direção ao tálamo. No caminho,

ramificações se projetam para áreas do tronco encefálico como a substância cinzenta periaqueductal (SCP), responsável pela via descendente inibitória da dor, e também para o núcleo reticular paragigantocelular (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

No tálamo é onde ocorre a última sinapse para que a informação nociceptiva alcance áreas corticais e sub-corticais para ser processada. O tálamo é importante pois ele funciona como uma “estação relé”, onde os estímulos sensoriais, incluindo os de caráter nociceptivo, são organizados, integrados e retransmitidos. No caso da dor, os estímulos nociceptivos são direcionados principalmente para o giro pós-central do córtex parietal (MILLAN, 1999), onde localiza-se o córtex sensorial primário. Outras regiões corticais e sub-corticais, como mesencéfalo, hipotálamo, núcleo lentiforme, córtices pré-frontal, insular, entre outras também estão envolvidas na circuitaria nociceptiva, e atribuem outras características além da discriminação sensorial propriamente dita, agregando componentes cognitivos e afetivos à nocicepção (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Em síntese, os neurônios de projeção oriundos do CDME fazem sinapse com neurônios localizados em núcleos talâmicos, que então transferem a informação nociceptiva para os respectivos centros responsáveis pelo seu processamento, completando a via transmissão das informações nociceptivas, possibilitando o seu processamento e culminando na percepção da sensação dolorosa.

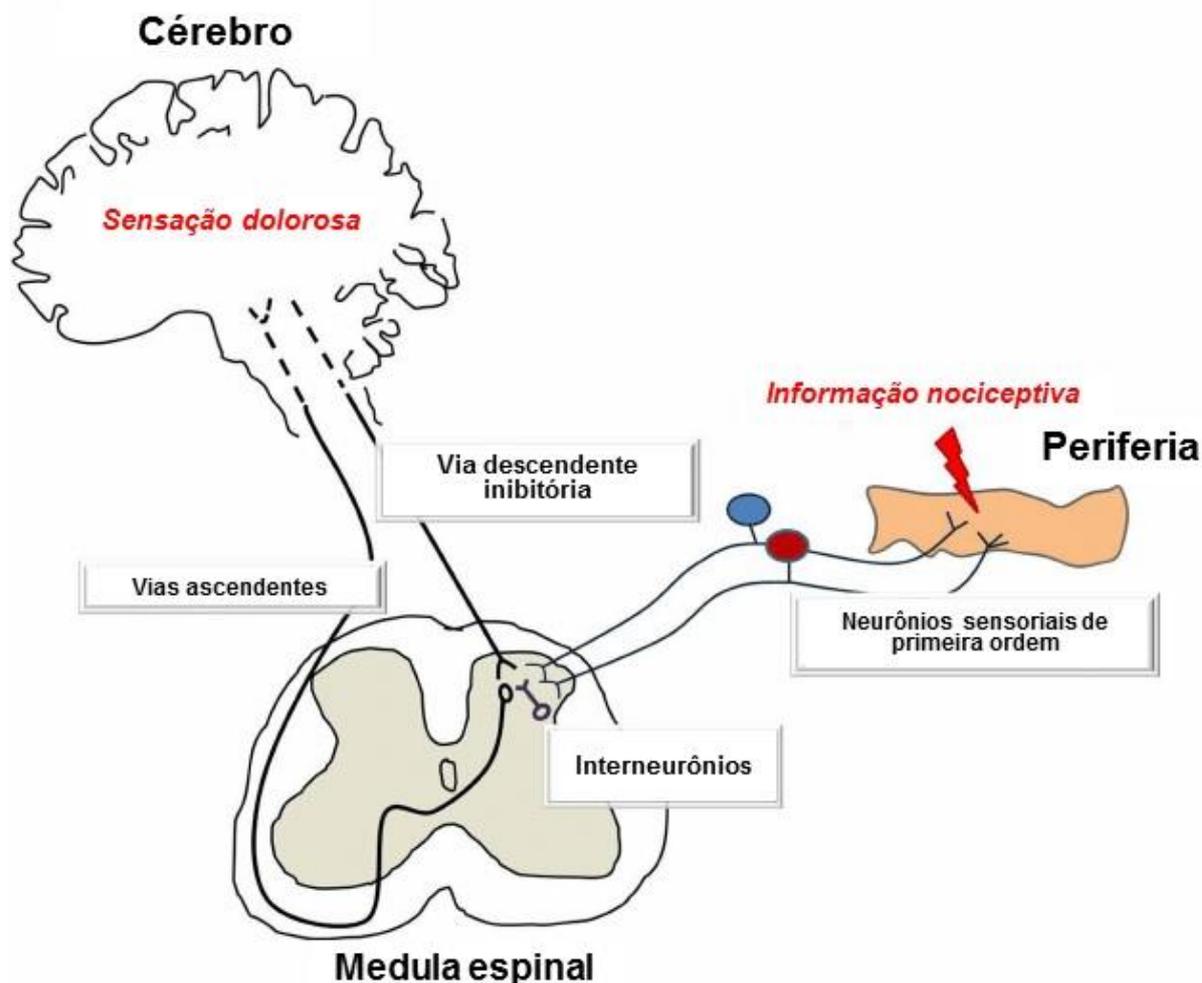


Figura 4 - representação da via nociceptiva.

Fonte: adaptado de Tavares e Martins (2013).

Nota: os neurônios nociceptivos de segunda ordem localizados no CDME fazem sinapse com neurônios de terceira ordem no tálamo, e então a informação nociceptiva é direcionada ao córtex.

2.3.2 A dor na OA

A nociceção é, portanto, uma resposta gerada pelo estímulo nocivo, sendo a dor a percepção subjetiva da nociceção. Sendo assim, a sensação dolorosa é subjetiva e influenciada por vários fatores, e a percepção da dor varia de indivíduo para indivíduo (KANDEL, 2014). Dentre as complicações decorrentes do desenvolvimento da OA, a dor é um sintoma amplamente relatado.

De forma aguda, a dor é produzida quando um estímulo de alta intensidade, que tem o potencial de provocar lesão tecidual, é detectado por nociceptores e dispara impulsos nociceptivos que são percebidos como dor. A dor aguda é transiente, e dura

no máximo semanas, persistindo apenas pelo período relacionado com a lesão ou inflamação, tendo a função de facilitar a recuperação e evitar mais danos. A dor crônica, em contrapartida, é uma dor recorrente que pode durar meses, ou por um período indefinido. A dor nesse casos não é mais protetora, originando-se de lesões ou inflamação prolongadas que resultam em alterações na via de transmissão e processamento nociceptiva, e nem sempre está correlacionada com o processo que desencadeou a dor em primeiro lugar (MILLIGAN; WATKINS, 2009)

A dor é um sintoma debilitante, e no caso da OA não é diferente. A OA é um distúrbio crônico e progressivo. Assim, a dor nesse processo também assume caráter crônico. A dor crônica é melhor caracterizada por um quadro doloroso que dura além do processo natural de cura (MERSKEY; BOGDUK, 2012).

Na OA, a dor articular é causada inicialmente por alterações estruturais e moleculares locais, desencadeadas pelos fatores de risco já discutidos. Apesar de a OA estar intimamente relacionada com dano estrutural na cartilagem, vale a pena salientar que a cartilagem em si é avascular e não apresenta inervação, por isso não pode gerar nocicepção diretamente. Entretanto, os demais tecidos articulares, como o osso sub-condral, tecido sinovial, ligamentos periarticulares e a cápsula articular são ricamente inervados, indiretamente atuando como a fonte de nocicepção (F. SALAFFI , A. CIAPETTI, 2014).

Na fase inicial da OA, pequenas fissuras na cartilagem aparecem. Com a progressão da patologia, as fissuras aumentam e pedaços de cartilagem podem se desprender, expondo a cartilagem calcificada e o osso subcondral. Microrrachaduras ocorrem na junção entre osso e cartilagem, e a estrutura da matriz extracelular da cartilagem modifica-se. Condrócitos têm sua função desregulada devido a alterações na matriz que os cerca, aumentando a síntese proteica na tentativa de prover reparo, sendo que a síntese de proteínas em condições normais é baixa, servindo apenas para manutenção do meio extracelular. Como resultado, ocorre depleção de proteoglicanas com conseqüente aumento na erosão cartilaginosa, acompanhada pela indução de agrecanases e outras proteinases. (PELLETIER et al., 2016). Fatores de transcrição relacionados com a inflamação, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) são suprarregulados (MARCU et al., 2010), assim como outras vias pró-inflamatórias associadas ao estresse. Ocorre também morte de condrocitos e mudança do perfil dos condrocitos remanescentes, que passam a secretar citocinas, quimiocinas, ROS e outros mediadores (PELLETIER et al., 2016).

Sendo assim, o dano articular na cartilagem e no osso subcondral pode estimular a liberação de vários fatores inflamatórios, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, enzimas catalíticas como proteinases, agrecanases e metaloproteinases de matriz, por exemplo. Esses fatores pró-inflamatórios, por sua vez, podem levar a uma degradação cartilaginosa acelerada e, pela proximidade física das estruturas dentro da articulação, também provocar efeitos deletérios nos tecidos adjacentes. Além da liberação dos mediadores inflamatórios, pode ocorrer formação de osteófitos, os quais podem sensibilizar terminações nervosas no tecido sinovial juntamente com os mediadores, uma soma de fatores que cooperam entre si para a dor (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; JOHNSON; HUNTER, 2014).

No processo patológico da OA, diversos mediadores inflamatórios são liberados na articulação, tais como bradicinina, prostaglandinas, histamina, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outros. Esses mediadores, além de contribuir para o processo inflamatório na articulação, podem induzir alterações na sensibilidade dos nociceptores articulares, diminuindo seus limiares de ativação, e fazendo com que estes sejam ativados mais facilmente tanto por estímulos nocivos como inócuos (HUNTER et al., 2009).

Essa sensibilização periférica dos nociceptores deve ser levada em consideração, pois, com a progressão da OA, mais e mais mediadores são liberados na articulação, perpetuando a sensibilização em um círculo vicioso. A alteração na sensibilidade dos nociceptores periféricos ocorre devido ao fato de os mediadores inflamatórios poderem se ligar a receptores específicos localizados nos nociceptores, resultando em alterações pós-traducionais em estruturas do nociceptor por meio de mensageiros intracelulares e, em longo prazo, alterações transcricionais, com expressão de genes específicos e alterações fenotípicas do nociceptor. Um exemplo de uma alteração pós-traducional seria a redução do limiar de ativação de um canal iônico causada pela modificação de sua estrutura em resposta à ativação por um mensageiro intracelular. O aumento na expressão de canais iônicos e outros receptores pelo nociceptor seria um exemplo de uma alteração transcricional (KIDD, 2012; WOOLF; COSTIGAN, 1999). Invariavelmente, esses mecanismos facilitam a despolarização dos nociceptores localizados na articulação, aumentando o *input* de informações nociceptivas que serão transmitidas ao SNC, resultando em uma percepção amplificada da dor.

2.3.3 Sensibilização central e envolvimento glial na dor

Associado ao componente periférico da nocicepção na OA, existe ainda um componente central que contribui para o estabelecimento e manutenção da dor crônica, servindo também para potencializar a percepção de dor nessa patologia.

Embora a dor em condições normais desempenhe um papel de proteção do organismo, em muitas síndromes clínicas ela perde essa característica, adquirindo um caráter patológico. Há casos em que a dor pode ser provocada por estímulos que normalmente são inócuos, o que caracteriza a alodinia. Em outros casos, a sensibilidade à dor torna-se exagerada e prolongada, de forma não compatível com o estímulo nocivo que a causou, o que define a hiperalgesia (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Isso ocorre porque, na maioria dos casos de dor patológica, a via nociceptiva pode estar sensibilizada, não somente na periferia, mas também a nível central.

Na ocorrência de um estímulo nociceptivo muito forte ou aplicado de forma persistente e repetida, existe a tendência à sensibilização do sistema nociceptivo de forma que o limiar de ativação de nociceptores ou neurônios da via nociceptiva no SNC é reduzido, possibilitando que estímulos nociceptivos subsequentes sejam potencializados. Apesar de essa sensibilização persistir além do fim do estímulo condicionante, ela é reversível e regride quando a fonte de estímulos nocivos é removida (WOOLF, 2012). Porém, a OA é um distúrbio crônico, o que torna impossível a remoção da fonte de estímulos nociceptivos, favorecendo a perpetuação da sensibilização central. Embora não necessariamente desejável, tal adaptação da via nociceptiva é dependente de uso e causa plasticidade de neurônios do SNC, permitindo que o sistema entre em um estado de alerta aumentado após exposição a um estímulo nocivo intenso (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

A sensibilização dos neurônios de projeção no CDME ocorre devido à liberação de neurotransmissores excitatórios pelas fibras A δ e C dos nociceptores, em especial o glutamato e substância P (Sub P), que provoca inicialmente alterações sinápticas entre o terminal pré-sináptico do nociceptor e o terminal pós-sináptico do neurônio de projeção. O fortalecimento da sinapse entre o nociceptor e o neurônio de projeção tem origem no influxo do cálcio (Ca^{2+}) desencadeado pelo glutamato e Sub P,

desbloqueando canais de Ca^{2+} previamente bloqueados por magnésio (Mg^{2+}). O aumento do Ca^{2+} intracelular também ativa colateralmente vias de sinalização intracelular que fosforilam receptores, aumentando a sensibilidade aos seus agonistas, ou aumentando a ativação de genes relacionados à produção e expressão de mais receptores. Tudo isso resulta numa facilitação da ativação dos neurônios de projeção pelos nociceptores (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

Devido ao fato de a sensibilização central resultar de alterações em neurônios nociceptivos do SNC, para onde informações da periferia convergem, componentes que anteriormente não participavam da nocicepção passam a oferecer contribuição. Como já mencionado, as fibras do tipo A δ e C em condições normais são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos e transmissão de impulsos nociceptivos, ativando neurônios de projeção da via nociceptiva localizados no CDME. Porém, outras projeções também convergem para o neurônio de projeção nociceptivo. Fibras de baixo limiar do tipo A β , as quais transferem principalmente estímulos inócuos de natureza mecânica, normalmente são alinhados de forma a ativar vias sensoriais de tato não doloroso, e seu potencial excitatório pré-sináptico não é capaz de ativar neurônios de projeção da via nociceptiva (WOOLF, 2012). Entretanto, quando os neurônios de segunda ordem se encontram sensibilizados, sua eficácia na recepção sináptica está aumentada e essas células despolarizam-se mais facilmente, de forma que estímulos oriundos das fibras A β também causam a despolarização dos neurônios de projeção da via nociceptiva. Assim, um estímulo inócuo, como o leve deslizar de uma pena sobre a pele, é capaz de provocar sensação dolorosa no indivíduo.

Além da sensibilização central resultante estritamente entre a interação entre neurônios descrita acima, outro fator contribui para a sensibilização da via nociceptiva a nível central. Muitos autores têm demonstrado que existe um componente neuroimune que também pode contribuir para a sensibilização de neurônios nociceptivos no CDME, e são as células da glia executam esse papel modulador da via nociceptiva no SNC (MILLIGAN; WATKINS, 2009; TSUDA, 2017; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). As células da glia são os demais tipos celulares presentes no SNC além dos neurônios. Apesar de existirem diferentes tipos de células da glia e cada uma desempenhar sua função de acordo com suas características, elas já foram consideradas no passado apenas células de suporte, responsáveis somente por preencher espaços no SNC. O termo “glía” é derivado do grego e significa “cola”, ou seja, essas células eram consideradas apenas arcabouço para sustentar os

neurônios. (JÄKEL; DIMOU, 2017). Entretanto, sabe-se agora que as células gliais não apenas propiciam suporte e manutenção da função neuronal, mas também podem interagir com os neurônios para modular a sua excitabilidade.

As células da glia no SNC incluem os astrócitos, a micróglia e os oligodendrócitos. Os astrócitos são o tipo predominante de células da glia, e suas funções vão desde manutenção da homeostase de líquido e íons do microambiente neuronal, participação na função, formação e plasticidade sináptica, até participação na barreira hematoencefálica (HILLEN; BURBACH; HOL, 2018; JÄKEL; DIMOU, 2017; KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010). A micróglia, por sua vez, representa o conjunto de células imunocompetentes do SNC. Elas apresentam capacidade fagocítica e permanecem “vigiando” o ambiente neuronal em busca de riscos potenciais (JÄKEL; DIMOU, 2017). Já os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização dos axônios dos neurônios no SNC, função importante que confere a esses axônios impulsos saltatórios que favorecem a velocidade de transmissão dos potenciais de ação. Apesar da função de manter um ambiente saudável no SNC em condições normais, há inúmeros relatos de que as células da glia podem assumir um perfil ativo na modulação da via nociceptiva (GRACE et al., 2014; MATSUO et al., 2014; MILLIGAN; WATKINS, 2009; SAGAR et al., 2011; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

As células da glia, além de expressarem receptores para os principais neurotransmissores excitatórios da via nociceptiva (MILLIGAN; WATKINS, 2009), expressam também receptores para outras moléculas sinalizadoras liberadas pelos nociceptores periféricos. Nieto e colaboradores, por exemplo, demonstraram que o CGRP liberado pelos nociceptores no CDME causa microgliose (estado de proliferação e hipertrofia das células microgлияis) associada a alodinia mecânica em um modelo animal de OA (NIETO et al., 2015). Outro exemplo pode ser representado por nociceptores expressando fractalquina, uma quimiocina também conhecida como CX3CL1, que também pode levar à ativação glial na presença de dor neuropática (VERGE et al., 2004). Dessa forma, moléculas liberadas por neurônios periféricos podem contribuir para a ativação das células da glia.

Ademais, as células da glia também apresentam receptores de reconhecimento de padrão (RRPs), como os receptores do tipo *toll* (TLR), que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a dano (DAMPs). Tem sido demonstrado que o receptor do tipo *toll* 4 (TLR4) em particular tem um papel

importante na hipersensibilidade dolorosa em modelos animais (KIELIAN, 2006). A detecção desses padrões pelos TLRs ativa cascatas intracelulares que culminam na ativação de genes responsáveis pela síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios. Uma via de sinalização bastante investigada com relação à produção de mediadores pró-inflamatórios em modelos de dor é a via das proteínas quinase associadas a mitógenos (MAPKs) (HU et al., 2015; LEE et al., 2011; MATSUO et al., 2014; PIAO et al., 2006). A ativação dessa via comumente resulta na ativação de NF- κ B, o qual perde a sua subunidade inibitória, transloca-se para o núcleo e ativa a maquinaria gênica relacionada com a produção de mediadores pró-inflamatórios (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997), mais notadamente citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF), entre outros. Por fim, as próprias citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células gliais podem ativar mais micróglia e astrócitos quiescentes de forma parácrina, criando uma alça de retroalimentação positiva, recrutando mais células glias. Sendo assim, estímulos de outras origens podem também ativar as células da glia e, por meio de vias específicas, levam à liberação de mediadores inflamatórios que induzem ou intensificam a sensibilização de neurônios de projeção nociceptivos no CDME.

Como já descrito, as células da glia ativadas liberam diversos mediadores pró-inflamatórios que formam uma “sopa” inflamatória no microambiente dos neurônios de projeção, contribuindo para sensibilizá-los ainda mais. Os neurônios localizados no CDME apresentam receptores para citocinas pró-inflamatórias. A ativação dos receptores de TNF α e IL-1 β nos neurônios, por exemplo, amplifica a excitabilidade neuronal pelo aumento da condutividade dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, além de aumentar a expressão desses receptores na superfície neuronal (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Adicionalmente, as citocinas pró-inflamatórias, atuando sobre o corpo neuronal dos nociceptores localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRDs), promovem a produção e liberação de NO e prostaglandina E₂ (PGE₂) (GRACE et al., 2014; MILLIGAN; WATKINS, 2009) pelo terminal pré-sináptico do nociceptor, substâncias que também estão envolvidas na amplificação da excitabilidade dos neurônios de projeção nociceptivos. Logo, as células da glia podem influenciar a excitabilidade dos neurônios nociceptivos no CDME, amplificando a transmissão nociceptiva e, finalmente, alterando a percepção da dor.

O papel das células da glia na nocicepção induzida pela OA tem sido relativamente bem descrito na literatura: Adões e colaboradores, usando um modelo

em ratos de OA induzida pela aplicação intra-articular (i.a.) de collagenase do tipo II, demonstrou que houve um aumento na expressão de marcadores de células da glia tanto nos GRDs como no CDME, indicando a ativação de células satélites gliais, astrócitos e micróglia seis semanas após a aplicação (ADÃES et al., 2017). Um estudo similar por Sagar e colaboradores encontrou resultados condizentes, dessa vez em um modelo de OA induzido pela aplicação intra-articular de iodoacetato monossódico (MIA). Em um intervalo de 28 dias, houve uma ativação maior de micróglia no período de 7 a 14 dias, sucedida por um aumento na ativação de astrócitos mais tardio, por volta do 28º dia, ambos na medula espinal. Os autores postulam que a ativação das células da glia ao longo da progressão da OA pode estar relacionada com o mecanismo de sensibilização central que contribui para a manutenção da dor crônica (SAGAR et al., 2011). Em ambos os estudos, a inibição da ativação das células da glia foi relacionada com a redução do comportamento nociceptivo nos animais avaliados, fortalecendo a suposição de que as células da glia participam do processo doloroso na OA (ADÃES et al., 2017; SAGAR et al., 2011). Outro estudo comprovou a ativação microglial em um modelo de OA induzida pela injeção i.a. de MIA em camundongos, embora a ativação glial varie com a idade (OGBONNA; CLARK; MALCANGIO, 2015). Aumento na ativação microglial também foi observado associado à liberação de CGRP pelo nociceptor em um modelo de OA induzida por MIA em camundongos (OGBONNA et al., 2013). Portanto, está bem definido que a OA tem a capacidade de promover a ativação de células da glia que, por sua vez, contribuem para a manutenção e amplificação no estado de dor patológica associada a essa patologia.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com ultrassom terapêutico ou laser na OA, e verificar se as células da glia na medula espinal podem participar da nocicepção em um modelo de osteoartrite induzida pela aplicação intra-articular de iodoacetato monossódico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do ultrassom terapêutico e do LASER em um modelo de OA em camundongos e a participação das células da glia espinais na nocicepção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente estudo foram os seguintes:

- a) Avaliar o limiar nociceptivo, marcha, temperatura e diâmetro articular de camundongos com OA.
- b) Avaliar a influência do tratamento diário com o ultrassom e laser na nocicepção, marcha, temperatura e diâmetro articular dos animais e também investigar a duração do efeito analgésico imediato da aplicação desses recursos;
- c) Avaliar a participação de micróglia e astrócitos espinais na nocicepção induzida pela OA por meio de ensaios farmacológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 150 camundongos da linhagem swiss machos (*Mus musculus*), pesando entre 35 e 45 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Ao longo do período dos experimentos, os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com temperatura controlada de 24 °C, e ciclo claro/escuro fixo de 12 horas cada. A disponibilidade de água e ração foi de livre acesso aos animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL sob o número de protocolo 49/2017.

4.2 MODELO DE OSTEOARTRITE

A OA foi induzida nos animais pela injeção i.a. de iodoacetato monossódico (MIA) (I2515 Sigma®). O MIA é um inibidor metabólico e, como tal, inibe a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) nos condrócitos da cartilagem articular, impedindo a glicólise e eventualmente levando à morte celular. Com a perda de condrócitos, ocorrem mudanças morfológicas que se assemelham à OA em humanos (GUZMAN et al., 2003b).

Para a injeção de MIA, os animais foram anestesiados com um coquetel de quetamina e xilazina diluído em salina estéril (0,5 mL de quetamina, 0,25 mL de xilazina em 4,25 mL de salina estéril), com aplicação intraperitoneal (i.p.) de 0,1 mL para cada 10 g do animal (quetamina 100 mg/Kg + xilazina 10 mg/Kg). A tricotomia da região articular do joelho do membro posterior direito com subsequente assepsia da pele no local com álcool 70% foram previamente realizadas. No momento da aplicação do MIA, a articulação do animal foi ligeiramente flexionada e tracionada; e o tendão patelar foi localizado por meio de palpação. Com uma seringa, utilizando uma agulha 26 G, uma dose única da solução com MIA foi injetada no espaço intra-articular

através do tendão patelar (PITCHER; SOUSA-VALENTE; MALCANGIO, 2016). O MIA foi solubilizado em salina estéril, e 0,1 mg de MIA foi injetado na articulação em um volume de 10 μ L, em uma dose de 3,4 mg/Kg. Para os animais controle, o mesmo volume (10 μ L) de salina estéril foi injetado no espaço intra-articular, seguindo o protocolo já descrito. Após a aplicação intra-articular, a articulação foi movimentada passivamente e massageada, para assegurar a distribuição da droga nos tecidos articulares. Após a aplicação, os animais foram colocados em uma superfície aquecida a 37 °C para manutenção da temperatura corporal até se recuperarem da anestesia.



Figura 5 - injeção i.a. de MIA ou salina.
Fonte: do autor.

4.3 DROGAS

Para investigar a participação das células da glia espinais na nocicepção causada pela OA, as seguintes drogas foram utilizadas no presente estudo:

- a) **Minociclina** (SIGMA®, EUA): a minociclina é um inibidor seletivo de micrógliã. Foram utilizados 30 e 60 ng de minociclina, diluídos em solução salina (0,9%) estéril. Foi injetado um volume de 5 μ L por via intratecal (i.t.), resultado nas doses de 0,001 mg/Kg e 0,002 mg/Kg respectivamente.

- b) **Fluorocitrato** (INVIVOGEN®, EUA): o fluorocitrato é um inibidor de astrócitos. Foram utilizados 150 e 300 pmol de fluorocitrato, diluídos em solução salina (0,9%) estéril. Foi injetado um volume de 5 uL por via i.t., resultando nas doses de 5 nmol/Kg e 10 nmol/Kg respectivamente.

4.4 VIA DE ADMINISTRAÇÃO

As drogas foram injetadas por via intratecal. Previamente, para padronizar o local correto de administração das drogas, foi efetuado um treinamento utilizando lidocaína 2% (DENSPLY PHARMACEUTICAL®, Japão) em um volume de 5 uL. A paralisia dos membros posteriores do animal confirmava a correta aplicação.

A injeção das drogas por via i.t. foi precedida pela tricotomia da região dorsal dos animais. Em seguida, álcool etílico 70% foi utilizado para assepsia da pele no local da injeção. Os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano 2% em oxigênio, com fluxo de 2,5 L/min, por meio de um vaporizador previamente calibrado. Os animais foram posicionados com o dorso ligeiramente flexionado, para distanciar as vértebras na região lombar. A reentrância entre os processos espinhosos da quarta e quinta vértebras lombares foi palpada, a agulha foi introduzida no espaço subaracnoideo e as drogas foram injetadas, uma vez identificado o reflexo de cauda (HYLDEN; WILCOX, 1980).

4.5 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

Como forma de investigar o comportamento nociceptivo dos animais, decorrente da evolução da OA, e os efeitos dos tratamentos fisioterapêuticos e farmacológicos na nocicepção, a avaliação do limiar nociceptivo foi efetuada utilizando os filamentos de *von Frey* (Aesthesia®, EUA). Com base no método descrito por Chaplan e colaboradores (1994), para testar o limiar nociceptivo, os animais foram colocados dentro de compartimentos de vidro separados, sobre uma grade metálica, e deixados para ambientação por 60 minutos, ou até que o comportamento agitado

tivesse diminuído o bastante para que o teste fosse realizado. Os filamentos foram aplicados de forma perpendicular sobre a superfície plantar da pata posterior direita do animal, iniciando-se com filamentos de menor espessura e progredindo com pressão crescente até que fosse percebido o comportamento nociceptivo do animal (“*flinch*” ou agitação, ou lambida da pata). Foram feitas três medições, intervaladas em no mínimo três minutos, e a média dos valores (em gramas) foi descrita como o limiar nociceptivo mecânico do animal, expressando a alodínia mecânica.

4.6 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ARTICULAR

Um dos sinais clínicos da OA investigados neste estudo foi o aumento da temperatura na região do joelho. Em um protocolo adaptado de Brenner (2006), para avaliação da temperatura articular, os animais foram anestesiados por uma mistura de isoflurano (2%) em oxigênio, com fluxo de 2,5 L/min. A temperatura da sala foi mantida a 20 °C em todas as coletas, para que a variação de temperatura do ambiente não influenciasse a avaliação. Foi feita a tricotomia dos pelos na região articular do joelho do membro posterior direito dos animais. Eles foram posicionados deitados sobre o dorso, para permitir a visualização das articulações, como exemplificado na figura 6. Para mensuração da temperatura articular, foi utilizada uma câmera termográfica FLIR E60bx (FLIR Systems, Oregon, EUA). A câmera foi posicionada mantendo uma distância de 17 cm para o joelho do animal no momento da captura. A análise das imagens termográficas foi efetuada em um computador utilizando o *software* FLIR Tools v 6.4.18. A temperatura na região articular é representada pela média (em graus Celsius) da temperatura dentro da área de avaliação, que foi a mesma para todas as imagens obtidas.

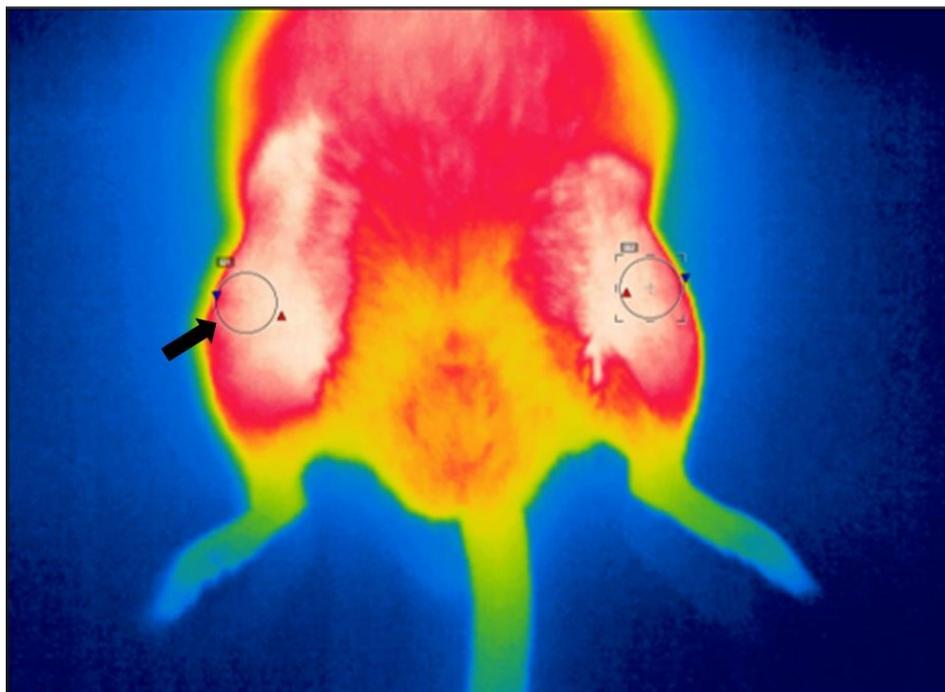


Figura 6 - imagem termográfica demonstrando o posicionamento do animal no momento da obtenção da imagem e a área de avaliação da temperatura articular.

Nota: a área interna do círculo indicado pela seta representa a área de avaliação da temperatura.

Fonte: do autor.

4.7 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO ARTICULAR

Juntamente com a temperatura articular, um outro parâmetro clínico avaliado foi o diâmetro do joelho dos animais. Os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano 2% em oxigênio, com fluxo de 2,5 L/min. A medida do diâmetro articular foi realizada utilizando um paquímetro convencional posicionado na linha articular do joelho. Durante a medição, o joelho do animal foi ligeiramente estendido, para remover a influência de dobras na pele. Foram realizadas 3 medições, e a média em centímetros (cm) foi assumida como diâmetro mediolateral da articulação do joelho (BERTOLINI et al., 2014).

4.8 AVALIAÇÃO DA MARCHA

Para avaliar o comportamento motor dos animais antes e após a indução da OA, foi utilizado um protocolo específico de análise de marcha. O animal foi colocado em uma plataforma com paredes e base de vidro, que permite a visualização lateral e inferior do animal. Inicialmente, cada animal foi colocado na plataforma previamente por, no mínimo, cinco minutos para ambientação, antes de qualquer filmagem. Foi necessário que o animal atravessasse a plataforma, locomovendo-se de um lado ao outro em uma marcha contínua, para que o vídeo fosse capturado. A marcha do animal, tanto do ponto de vista lateral (plano sagital) como do ponto de vista inferior (plano transversal), foi registrada por meio de vídeo utilizando uma câmera Nikon Coolpix P100 (Nikon Corp., Japão). A vista inferior do animal foi registrada por meio do reflexo projetado em um espelho, posicionado logo abaixo à plataforma, em um ângulo de 45°. O vídeo posteriormente foi analisado em um computador utilizando um *software* de código livre de análise de vídeo denominado *Kinovea*.

As variáveis investigadas foram, no plano sagital: os ângulos articulares das articulações do joelho e tornozelo; no plano transversal: a área de contato da pata posterior direita com a superfície, calculada por meio das dimensões longitudinais (entre a ponta do terceiro dígito e o ponto de contato mais posterior da superfície plantar com o vidro) e laterais da pata (entre a ponta do primeiro e do quinto dígito). Considerando que alterações da impressão da área da pata e da descarga de peso em animais podem indicar possíveis alterações musculoesqueléticas (JACOBS; KLOEFKORN; ALLEN, 2014), por esse motivo a área plantar foi avaliada.

Para melhor visualização dos ângulos articulares, foi realizada tricotomia da região do quadril, coxa, joelho e parte do dorso do lado direito do animal. Pontos de referência foram marcados no animal para facilitar a obtenção dos ângulos, sendo esses: as faces laterais do joelho e tornozelo direitos, e a crista ilíaca, a partir da qual foi marcado um ponto sobre a articulação do quadril. A disposição dos pontos e a obtenção dos ângulos articulares podem ser visualizadas na figura 7. A amplitude articular do joelho e tornozelo direitos foi capturada na fase de apoio médio do membro posterior direito, enquanto o membro contralateral encontrava-se em fase de balanço. O mesmo foi preconizado para a captura das dimensões da pata.

Para a análise da área da pata, necessitou-se de uma medida de calibração. Com esta finalidade, uma fita com a largura conhecida de 1,8 cm foi pregada na plataforma para possibilitar a calibração das medidas. A obtenção da área da pata a partir de suas dimensões longitudinais e laterais está representada na figura 7.

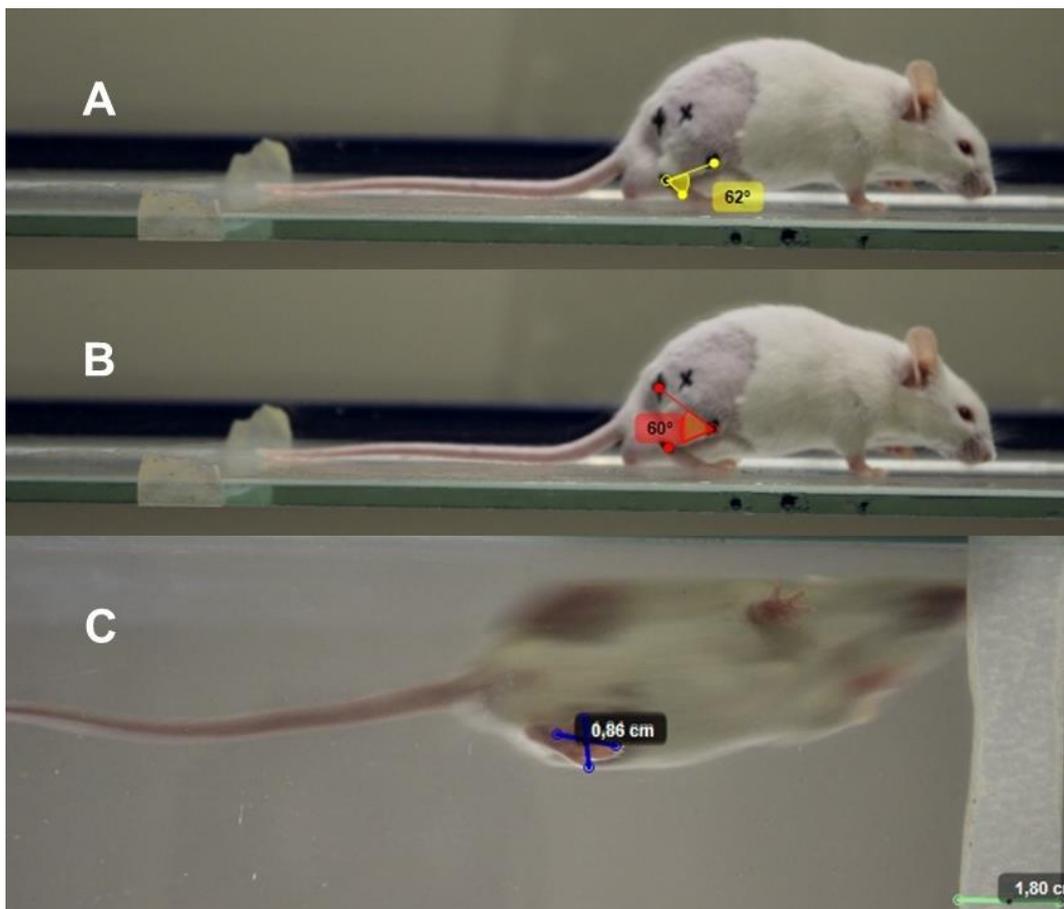


Figura 7 – representação da marcação dos pontos de referência e dos ângulos articulares através do *software* Kinovea.

Nota: A: amplitude da articulação do tornozelo; B: amplitude da articulação do joelho; C: representação das dimensões longitudinal e transversal da pata e da medida de calibração do *software*.

Fonte: do autor.

Foram obtidas 3 medidas, em diferentes momentos da marcha do animal, do ângulo articular do joelho e das dimensões longitudinal e transversal da pata. A média dos valores dos 3 ângulos obtidos foi finalmente utilizada como o ângulo articular do joelho. A média do produto entre as medidas das dimensões longitudinal e transversal da pata do animal foi assumida como a área plantar da pata, como exemplificado na figura 8.

$$Ap = \frac{(dl1 \times dt1) \times (dl2 \times dt2) \times (dl3 \times dt3)}{3}$$

Figura 8 – cálculo da área plantar da pata direita do animal, onde:

Ap: área plantar

dl: dimensão longitudinal

dt: dimensão transversal

Fonte: do autor.

4.9 APLICAÇÃO DOS RECURSOS FISIOTERAPÊUTICOS

Os animais foram tratados com dois tipos de recursos fisioterapêuticos: US e LASER. Para a aplicação dos recursos fisioterapêuticos, os animais permaneceram anestesiados a fim de assegurar que o tratamento com os recursos fosse conduzido de forma eficaz, sem que o animal se movesse e perturbasse a aplicação. Foi utilizada uma mistura de 2% de isoflurano em oxigênio, com fluxo de 2,5 L/min, que foi gerado por um vaporizador de isoflurano previamente calibrado, ofertada ao animal por meio de um cone posicionado à frente da cabeça do camundongo. A aplicação e os parâmetros específicos de cada recurso estão detalhados a seguir.

4.9.1 Ultrassom terapêutico

Para aplicação do US, o animal foi anestesiado como previamente descrito. Foi utilizada a modalidade subaquática do ultrassom, devido à incompatibilidade de tamanho entre o cabeçote emissor de ultrassom e a pequena área de aplicação sobre a articulação do animal. O camundongo foi então posicionado de forma que o joelho posterior direito estivesse submerso em um recipiente com água, que foi o meio acoplador para a transmissão das ondas ultrassônicas. Finalmente, o cabeçote do aparelho de ultrassom foi totalmente submerso na água para aplicação do recurso, mantido a uma distância de 1 cm da área tratada, com movimentos circulares rítmicos do cabeçote (figura 9). Foi utilizado um aparelho de ultrassom terapêutico comercial Sonopulse III (IBRAMED®), cujo transdutor apresenta uma área efetiva de radiação (ERA) de 7 cm², ajustado com os seguintes parâmetros: frequência de 1 Mhz, intensidade de 1 W/cm², pulso contínuo e tempo de aplicação de 5 minutos (ÖZGÖNENEL; AYTEKIN; DURMUŞOĞLU, 2009).



Figura 9 – tratamento com ultrassom subaquático.
Fonte: do autor.

4.9.2 LASER

Assim como na aplicação de US, o animal permaneceu anestesiado como descrito anteriormente. O laser foi aplicado em dois pontos na articulação do joelho posterior direito do animal, sendo um ponto na região da linha articular medial e outro na linha articular lateral, como exemplificado na figura 10. Foi utilizado um aparelho comercial LASER HTM Compact (HTM Eletrônica[®]), cujo diodo de GaAlAs emite radiação eletromagnética infravermelha no comprimento de onda de 830 nm do espectro de luz. A densidade de energia total de aplicação foi de 16 J/cm², administrada em duas aplicações consecutivas com duração de 100 segundos nos pontos de aplicação relatados acima, com energia de 1 J em cada ponto (CORADINI et al., 2014). A potência total foi de 0,01 W, com regime contínuo de emissão do laser, resultando em uma potência média de saída foi de 0,01 W, e a área do feixe foi de 0,1257 cm².



Figura 10 - representação do tratamento com LASER.
Fonte: do autor.

4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Com o intuito de verificar a morfologia, o dano articular resultante da OA e o efeito do tratamento com os recursos fisioterapêuticos na progressão da doença, foi realizada a análise histológica da articulação do joelho do membro posterior direito dos animais.

Para isso, após 21 dias de tratamento, os animais que receberam MIA ou salina i.a. foram sacrificados e as articulações foram extraídas, preservando a cápsula articular e o terço distal do fêmur e proximal da tíbia. A fíbula foi descartada. Essas articulações foram então fixadas em formaldeído tamponado 10% por 24 horas, e então colocadas em uma solução descalcificadora composta de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 12%, por 30 dias. Após descalcificação, o tecido foi processado para inclusão em parafina, passando por um processo de desidratação em uma série de banhos em álcool 70%, álcool 90%, álcool 95%, álcool absoluto, álcool absoluto + xilol e xilol. A partir disso, as articulações foram inseridas em cassetes específicos e banhadas em parafina *overnight*. No dia seguinte, as articulações foram retiradas do

banho de parafina e colocadas na posição de inclusão em recipientes específicos contendo parafina. As articulações foram incluídas de forma a possibilitar cortes sagitais.

Com os blocos de parafina prontos, foram retirados cortes sagitais da articulação com espessura de 5 micrômetros (μm) utilizando um micrótomo. Os cortes foram fixados em lâminas histológicas foscas lapidadas com 26 x 76 x 1 mm (largura x comprimento x espessura) com o auxílio de uma solução 1:1 de água e álcool absoluto. Depois, os cortes foram corados por meio de hematoxilina e eosina (HE) e uma lamínula foi aplicada sobre os cortes em cada lâmina.

Os cortes histológicos das articulações foram visualizados e fotografados em um microscópio Axiophot (Zeiss Microscopy, Alemanha) equipado com uma câmera para captura Toupcam (ToupTek Photonics Co, China), conectado a um computador rodando o *software* ToupView versão 3.7.64.54. Foram fotografadas as cartilagens articulares da extremidade femoral e tibial. As imagens foram obtidas com as lentes objetivas de 10, 20 e 40x e foram observadas em busca de lesão tecidual nas cartilagens articulares dos platôs tibiais e dos côndilos femorais.

4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, foram investigados os efeitos nociceptivos da aplicação i.a. de MIA ou seu veículo (Experimento 1). Dessa forma, dois grupos de seis animais foram utilizados: animais que receberam MIA i.a. (MIA) comparados aos animais controle, que receberam salina i.a. (SAL). A medida basal (MB) do limiar nociceptivo mecânico foi obtida previamente à injeção, e outras medidas foram realizadas 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após a injeção, como exemplificado na figura 11. A avaliação do limiar nociceptivo ao longo do tempo teve também o objetivo de estabelecer o dia do pico nociceptivo, ou seja, o dia em que os animais demonstraram maior nocicepção. O dia do pico nociceptivo foi então utilizado para os experimentos farmacológicos. No 21º dia, os animais foram eutanasiados.

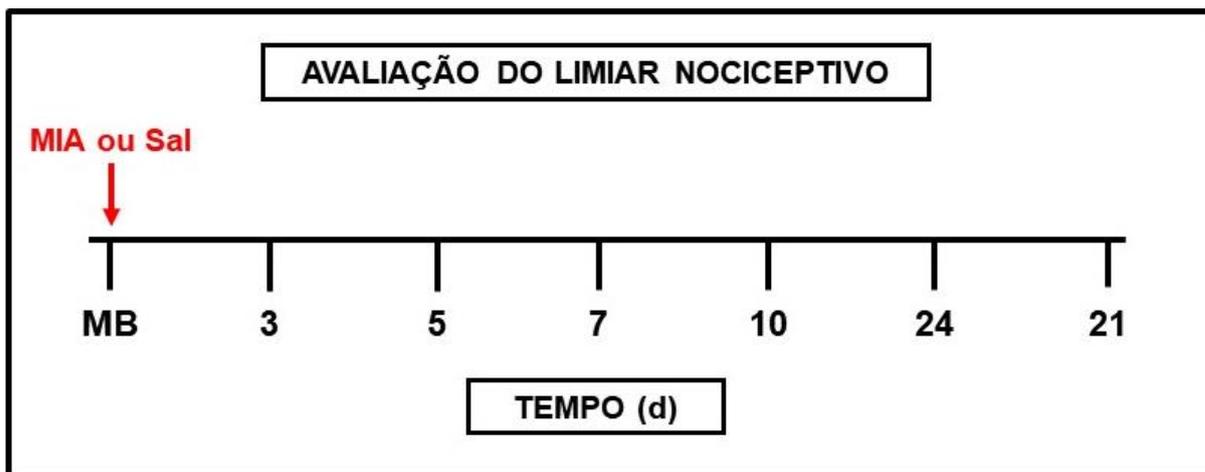


Figura 11 – Experimento 1: avaliação do limiar nociceptivo de animais que receberam MIA ou salina i.a. ao longo de 21 dias.

Nota: MB: medida basal.

Fonte: do autor.

Estabelecido o modelo nociceptivo, como parte do Experimento 2, foi avaliado o efeito do tratamento diário com US ou LASER, aplicados diariamente por 21 dias, na nocicepção induzida pela OA. Para isso, foram utilizados seis grupos contendo seis animais cada, sendo esses grupos compostos por: a) animais que receberam apenas MIA i.a. (MIA); b) animais que receberam apenas salina i.a. (SAL); c) animais que receberam MIA i.a. tratados com US (MIA/US); d) animais que receberam MIA i.a. tratados com LASER (MIA/LASER); e) animais que receberam salina i.a. tratados com US (SAL/US); f) e animais que receberam salina i.a. tratados com LASER (SAL/LASER). Nesses grupos, foi realizada uma medida basal do limiar nociceptivo mecânico antes da injeção articular e 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após, como pode ser visto na figura 12.

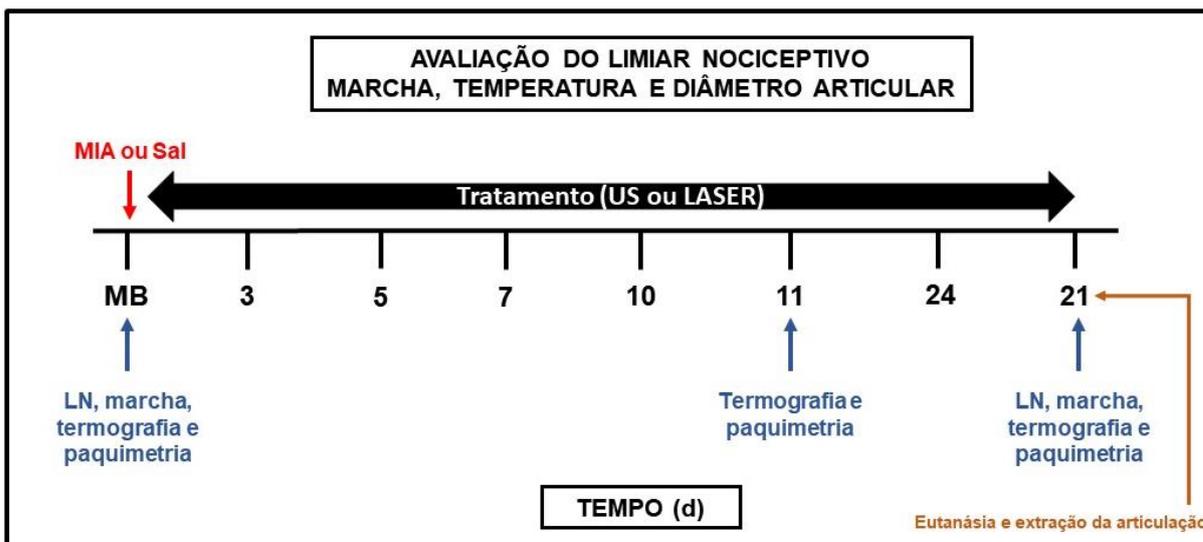


Figura 12 – Experimento 2: avaliação do limiar nociceptivo mecânico, marcha, temperatura e diâmetro articular de animais que receberam MIA ou salina i.a., tratados diariamente por 21 dias com US ou LASER.

Nota: MB: medida basal; LN: limiar nociceptivo.

Fonte: do autor.

Nesses mesmos grupos, foi efetuada também a avaliação da temperatura articular por meio da termografia e do diâmetro articular por meio da paquimetria, sendo que a medida basal foi obtida antes da injeção i.a. de MIA ou salina, e outras avaliações foram realizadas 11 e 21 dias após a injeção, como exemplificado na figura 13, como mostra a figura 12.

Ainda nos grupos descritos acima, foi feita a captura dos vídeos para análise da marcha dos animais. Para isso, a marcha dos animais foi capturada antes da injeção i.a. de MIA ou salina (MB) e após 21 dias. A figura 12 representa a organização deste experimento.

Uma vez avaliado o efeito cumulativo do tratamento diário com US ou LASER, o Experimento 3 foi realizado com a intenção de verificar a duração do efeito de uma única aplicação de US ou LASER na nocicepção provocada pela OA. Para isso, quatro grupos com seis animais cada foram organizados da seguinte forma: a) animais que receberam apenas MIA i.a. (MIA); b) animais controle que receberam apenas salina i.a. (SAL); c) animais que receberam MIA i.a. tratados com US (MIA/US); d) e animais que receberam MIA i.a. tratados com LASER (MIA/LASER). A medida basal do limiar nociceptivo mecânico foi efetuada e então esses animais receberam, por via i.a., uma injeção de MIA ou salina. 14 dias depois (com base no efeito antinociceptivo demonstrado pelo tratamento diário com US ou LASER), os animais foram tratados

uma única vez com US ou LASER, e avaliados 1, 3, 5, 7 e 24 horas após o tratamento. A Figura 13 demonstra o delineamento deste experimento.

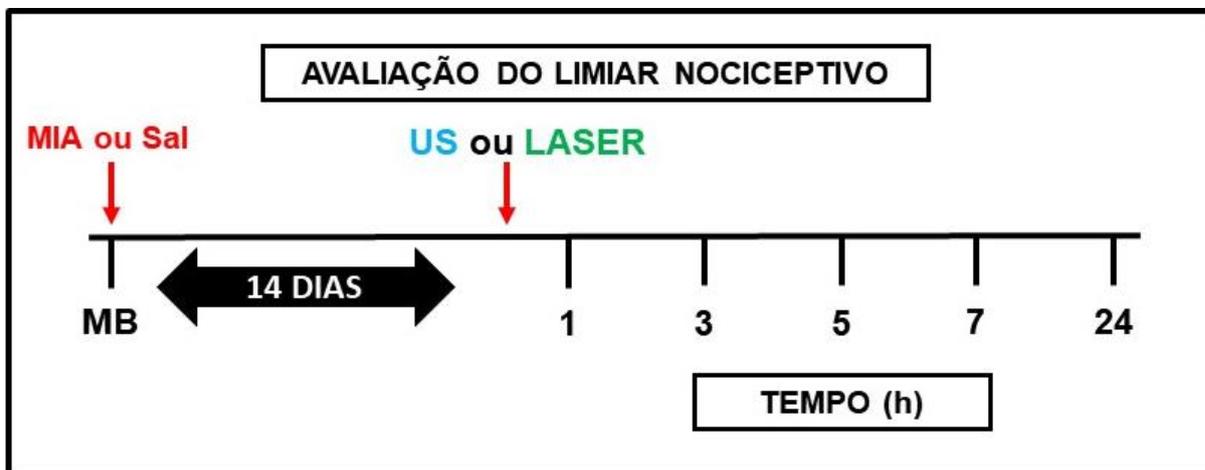


Figura 13 – Experimento 3: avaliação do limiar nociceptivo mecânico de animais que receberam MIA ou salina i.a. e receberam um único tratamento com US ou LASER no 14º dia após a injeção.

Nota: MB: medida basal.

Fonte: do autor.

Em seguida, foi realizado o Experimento 4 para verificar se a nocicepção causada pela OA apresentava participação das células da glia espinais. Primeiramente, foi investigada a participação da micróglia na nocicepção, e para isso foram utilizados cinco grupos compostos por seis animais cada. Os grupos foram divididos da seguinte forma: a) animais que receberam injeção i.a. de MIA e veículo da minociclina i.t. (MIA/Vec); b) animais que receberam salina i.a. e veículo i.t. (SAL/Vec); c) animais que receberam injeção i.a. de MIA e 30 ng de minociclina i.t. (MIA/Mino 30 ng); d) animais que receberam salina i.a. e 30 ng de minociclina i.t. (SAL/Mino 30 ng); e) e animais que receberam MIA i.a. e 60 ng de minociclina i.t. (MIA/Mino 60 ng). Primeiramente, foi realizada uma medida basal do limiar nociceptivo mecânico em cada animal antes da injeção i.a. de MIA ou salina e, no décimo dia pós aplicação (o dia do pico nociceptivo provocado pela injeção de MIA), foi realizada a injeção por via i.t. da minociclina, seguida pela avaliação do limiar nociceptivo novamente 1, 3, 5, 7 e 24 horas após, como pode ser observado na Figura 14.

Por fim, três outros grupos, contendo seis animais cada, foram utilizados para investigar a participação dos astrócitos espinais na nocicepção provocada pela OA. Para esse fim, os grupos foram assim organizados: a) animais que receberam salina i.a. e 300 pmol de fluorocitrato por via i.t.; b) animais que receberam MIA i.a. e 150 pmol de fluorocitrato por via i.t.; c) e animais que receberam MIA i.a. e 300 pmol de

fluorocitrato por via i.t. Tal experimento foi delineado similarmente aos experimentos com a minociclina, como visto na Figura 14.

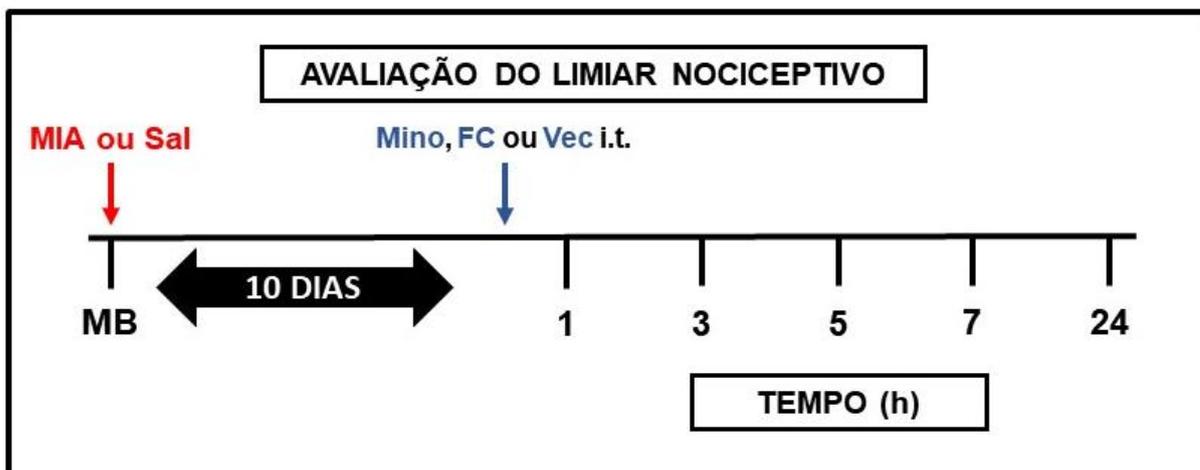


Figura 14 – Experimento 4: avaliação do limiar nociceptivo mecânico de animais que receberam aplicação i.a. de MIA ou salina, tratados com a injeção i.t. de minociclina ou fluorocitrato.

Nota: MB: medida basal; Mino: minociclina; FC: fluorocitrato.

Fonte: do autor.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais de limiar nociceptivo mecânico, foi utilizada a análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA). As análises foram seguidas pelo pós-teste Bonferroni de múltiplas comparações. Os dados de termografia e paquimetria foram analisados por meio da análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) seguida do pós-teste Tukey. Para todas as análises, foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas e elaboração de figuras foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO DA OA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE MIA

Inicialmente, com objetivo de padronizar e estabelecer o modelo de OA, um grupo de seis animais foi submetido à administração i.a. de MIA (MIA), enquanto outro grupo, também contendo 6 animais, foi submetido à injeção i.a. de salina estéril (SAL). Como pode ser observado no gráfico 1, a partir do terceiro dia após a administração do MIA, os animais apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$ no dia 3; $p < 0,01$ nos demais tempos; $p < 0,001$ no dia 10; $f_{1,10} = 1,002$) do limiar nociceptivo no teste de *von Frey*, o que indica a nocicepção resultante da injeção de MIA. Essa queda no limiar nociceptivo manteve-se estável do quinto até o 21º dia de experimento. No 10º dia ocorreu a maior diferença no limiar nociceptivo dos animais que receberam MIA em relação aos animais controle ($p < 0,001$; $f_{1,10} = 1,002$), sendo assim considerado o dia do pico nociceptivo.

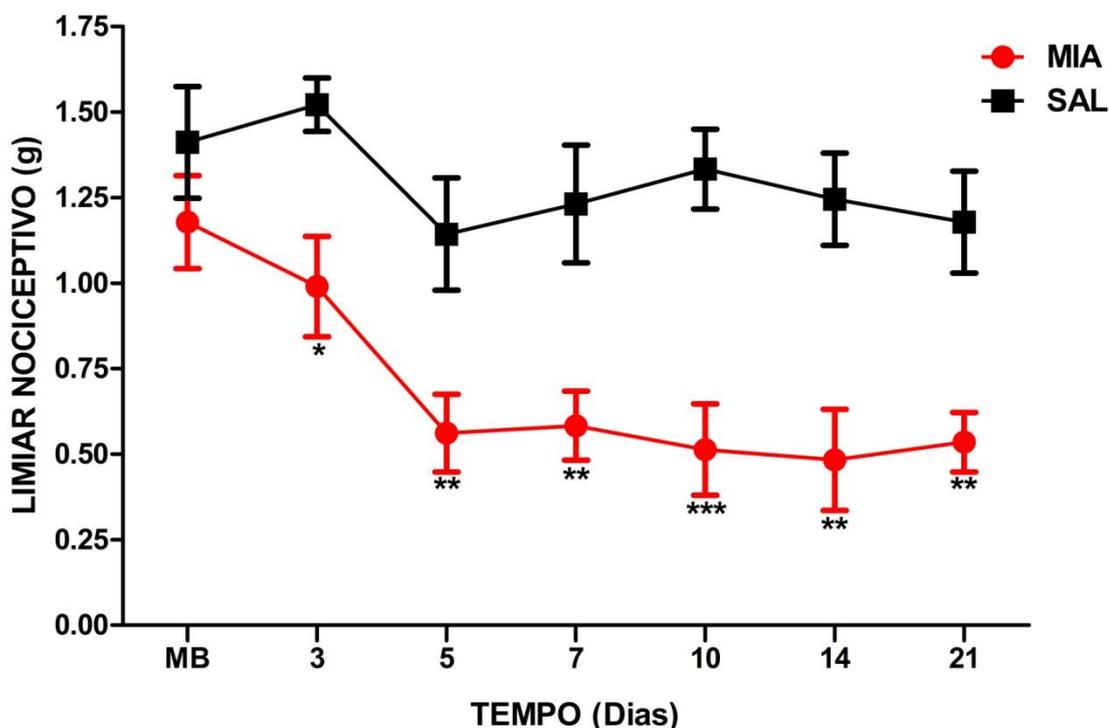


Gráfico 1 – avaliação da nocicepção associada à OA induzida por MIA. Foi realizada uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB) e depois 3, 5, 7, 10, 14 e 24 dias após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em

gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. * indica significância estatística ($p < 0,05$); ** indica significância estatística ($p < 0,01$); e *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL.

5.2 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TRATAMENTO DIÁRIO COM US OU LASER NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA

Uma vez estabelecido o modelo, foi investigado o efeito do tratamento com os recursos fisioterapêuticos na nocicepção provocada pela OA. Primeiramente, o gráfico 2 mostra o efeito antinociceptivo em animais tratados com US diariamente, ao longo de 21 dias. Os animais que receberam MIA por via i.a. e que não foram tratados (MIA) apresentaram queda significativa no limiar nociceptivo a partir do terceiro dia, até o 21º dia ($p < 0,01$ no quinto dia; $p < 0,001$ nos demais dias; $f_{3,20} = 2,820$). Não foi observada variação do limiar nociceptivo mecânico dos animais que receberam salina i.a., tratados (SAL/US) ou não (SAL). No 10º dia de avaliação, os animais que receberam MIA i.a. tratados com US (MIA/US) também demonstraram uma redução significativa do limiar nociceptivo mecânico ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL. No entanto, é possível notar que, nos dias 14 ($p < 0,05$; $f_{3,20} = 2,820$) e 21 ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 2,820$) de tratamento com US, houve uma atenuação da nocicepção nos animais do grupo MIA/US em relação aos animais do grupo MIA e esse efeito se manteve até o último dia de avaliação do limiar nociceptivo mecânico. Isso demonstra que o tratamento com US apresenta efeito antinociceptivo que se manifesta tardiamente, quando aplicado diariamente.

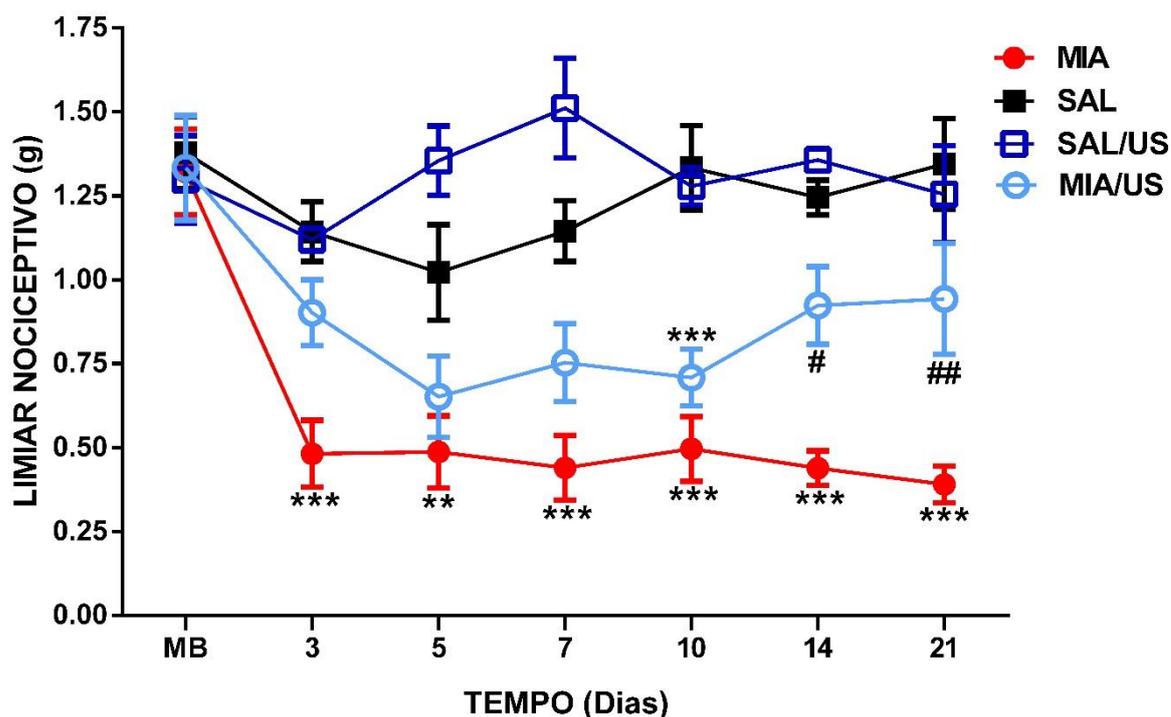


Gráfico 2 - avaliação do efeito antinociceptivo do tratamento com o US na nocicepção associada à OA induzida por MIA. Foi realizada uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB) e depois 3, 5, 7, 10, 14 e 24 dias após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. ** indica significância estatística ($p < 0,01$); e *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL; # indica significância estatística ($p < 0,05$); e ## indica significância estatística ($p < 0,01$) em relação ao grupo MIA.

Similarmente, o gráfico 3 representa o limiar nociceptivo de animais com OA tratados com LASER e os demais grupos controle. A exemplo do ocorrido anteriormente, os animais não tratados que receberam MIA i.a. (MIA) apresentaram queda significativa do limiar nociceptivo em relação aos que receberam salina (SAL) a partir do terceiro dia, que se manteve até o 21º dia. Houve também uma redução significativa ($p < 0,01$) do limiar nociceptivo dos animais que receberam MIA i.a. tratados com LASER em relação ao grupo SAL no 21º dia apenas. Os animais que receberam salina i.a., tratados (SAL/LASER) ou não (SAL), não apresentaram variação do limiar nociceptivo mecânico basal. É possível observar, por sua vez, que o LASER foi capaz de atenuar intermitentemente a nocicepção provocada pela OA nos dias 3 ($p < 0,01$; $f_{3,20} = 1,976$), 10 ($p < 0,05$; $f_{3,20} = 1,976$) e 14 ($p < 0,001$; $f_{3,20} = 1,976$) após a injeção i.a. de MIA (MIA/LASER). Cabe salientar que, apesar de não ter sido observada significância estatística em relação aos animais MIA nos demais tempos de avaliação, existe uma tendência à antinocicepção que não deve ser

descartada. Com isso, verifica-se que o LASER também promove antinocicepção quando aplicado diariamente, a qual se manifesta mais precocemente após o início do tratamento.

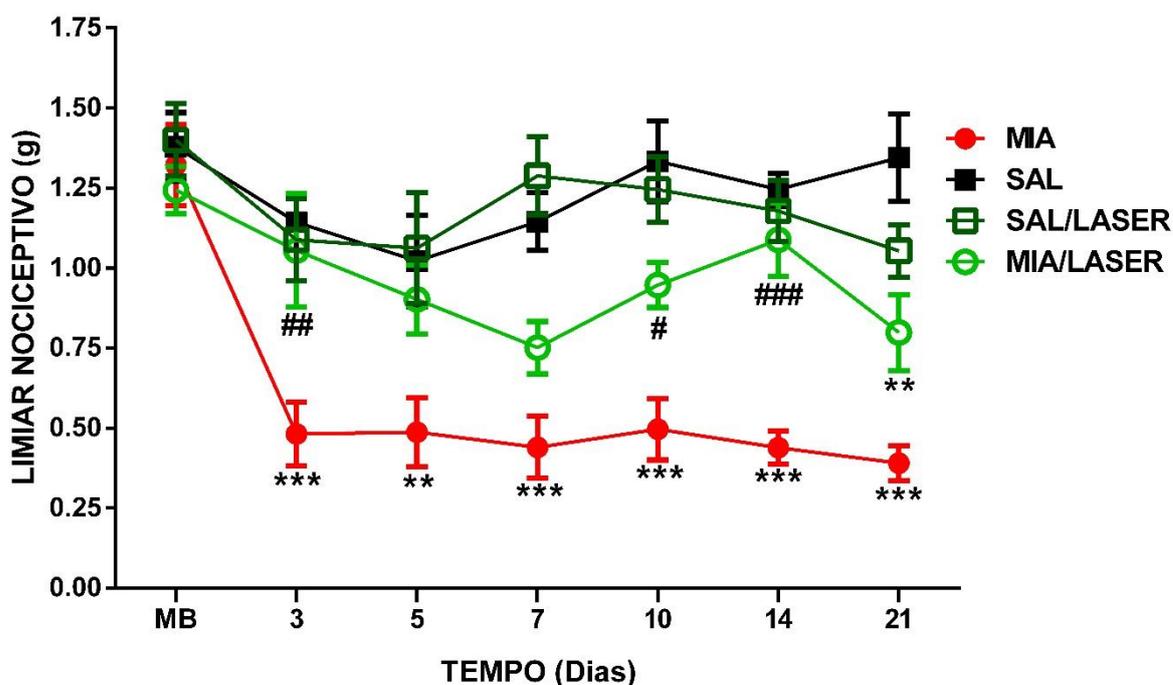


Gráfico 3 - avaliação do efeito antinociceptivo do tratamento com o LASER na nocicepção associada à OA induzida por MIA. Foi realizada uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB) e depois 3, 5, 7, 10, 14 e 24 dias após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL; # indica significância estatística ($p < 0,05$); ## indica significância estatística ($p < 0,01$); e ### indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo MIA.

5.3 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UMA ÚNICA APLICAÇÃO DE US OU LASER NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA

Haja vista que foi observado efeito analgésico tanto do US como do LASER quando aplicados diariamente, foi investigado, portanto, o efeito de um único tratamento com esses recursos objetivando identificar a duração desse efeito logo após a aplicação. Para esse fim, animais que receberam MIA por via i.a. foram tratados uma única vez com US (MIA/US) ou LASER (MIA/LASER) no 14º dia após a injeção, e depois avaliados quanto ao limiar nociceptivo mecânico uma, três, cinco,

sete e 24 horas após o tratamento. O 14º dia foi arbitrariamente escolhido considerando que tanto o US como o LASER promoveram uma atenuação da nocicepção induzida pela OA nesse período do tratamento, como é possível observar nos gráficos 2 e 3. Sendo assim, o gráfico 4 expressa o limiar nociceptivo mecânico desses animais. Verificou-se que os animais que receberam MIA i.a. (MIA) apresentaram uma redução significativa ($p < 0,001$; $f_{3,19} = 2,691$) do limiar nociceptivo mecânico em relação aos animais que receberam salina i.a. (SAL) em todos os tempos avaliados. É possível observar também que o US e o LASER foram capazes de reverter a nocicepção provocada pela OA (respectivamente $p < 0,01$; $p < 0,001$; $f_{3,19} = 2,691$) uma hora após a aplicação, sendo que, em nenhum dos casos, esse efeito se manteve na terceira hora em diante, ou seja, os animais do grupo MIA/US e MIA/LASER demonstraram limiar nociceptivo significativamente menor do que os animais do grupo SAL da 3ª à 24ª hora..

Com isso, verifica-se que o US e o LASER apresentam efeito antinociceptivo imediatamente após a sua aplicação no modelo de OA estudado, com duração de aproximadamente uma hora.

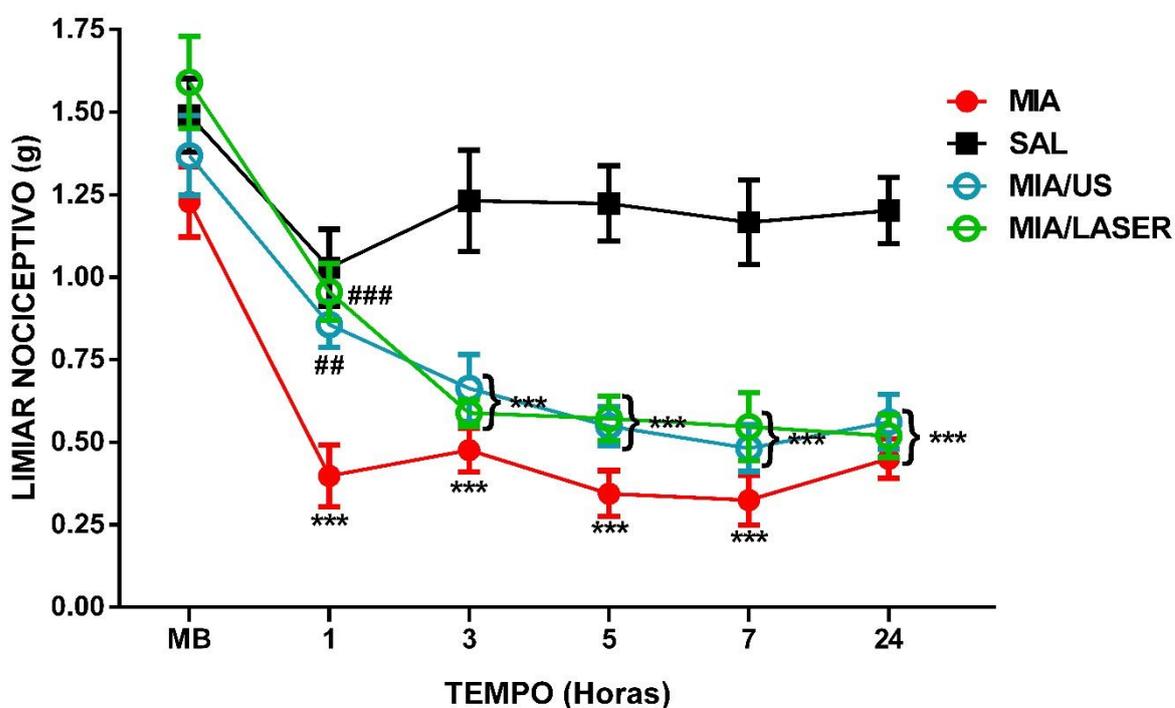


Gráfico 4: avaliação da duração do efeito antinociceptivo de um único tratamento com US ou LASER na nocicepção associada à osteoartrite induzida por MIA. Foi realizada uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB) e depois 1, 3, 5, 7 e 24 horas após o tratamento com US ou LASER. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de

comparações múltiplas Bonferroni. *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL; ## indica significância estatística ($p < 0,01$); e ### indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo MIA.

5.4 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ARTICULAR NA OA E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM US OU LASER

Considerando que a OA pode não apresentar somente a dor, foram investigados neste estudo outros sinais clínicos que normalmente ocorrem simultaneamente na OA. Um dos sinais clínicos foi a possível elevação da temperatura articular como resultado da inflamação decorrente do processo da OA. O gráfico 5 representa a avaliação da temperatura articular por meio da termografia. Como pode ser observado, na medida basal, os animais do grupo MIA apresentaram temperatura do joelho direito significativamente mais baixa que os animais dos demais grupos ($p < 0,05$). No dia 11 e 22 após a injeção i.a. de MIA ou salina, nenhuma diferença foi observada entre os grupos avaliados. Os animais do grupo MIA demonstraram um aumento significativo na temperatura articular no dia 11 após a injeção i.a. de MIA ($p < 0,01$) e também no dia 21 ($p < 0,001$) em relação à medida basal, evento o qual não foi observado nos demais grupos. Houve também aumento significativo da temperatura articular no dia 21 em relação ao dia 11 ($p < 0,05$) nos animais que receberam MIA i.a. Apesar de os grupos tratados exibirem uma temperatura ligeiramente menor que os grupos MIA e SAL no 21º dia, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Desse modo, foi possível verificar que os tratamentos não alteraram o aumento da temperatura local.

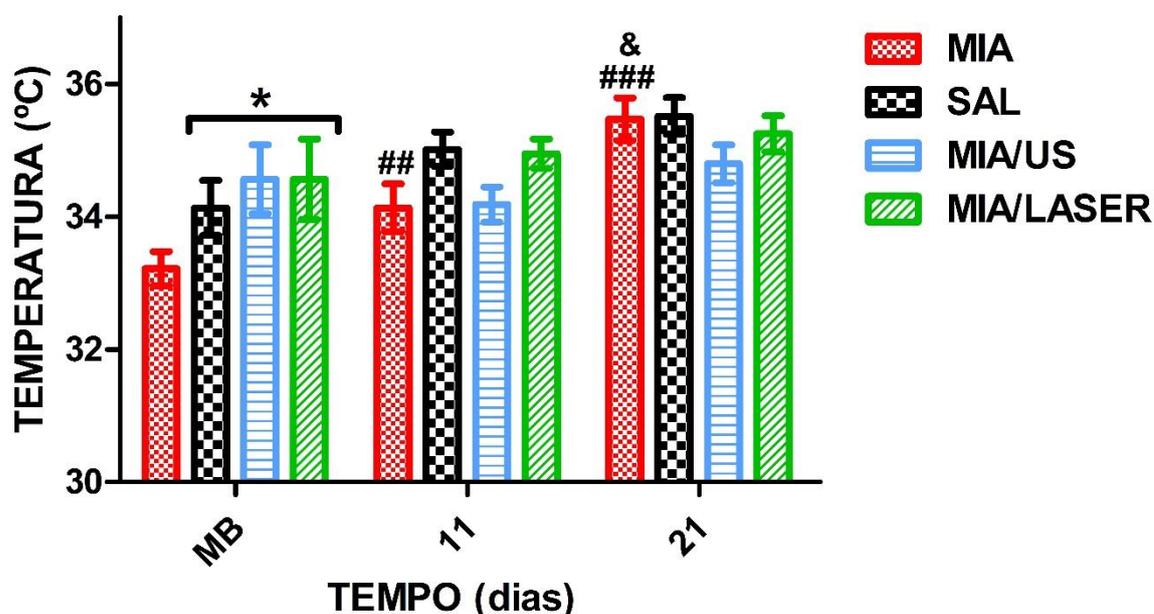


Gráfico 5 - avaliação da temperatura articular do joelho direito dos animais e a influência do tratamento com US ou LASER na temperatura articular, obtida por meio de termografia. Foi realizada inicialmente uma medida basal (MB) da temperatura articular antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB), e então nos dias 11 e 21 após a injeção, sendo que o tratamento com US ou LASER foi realizado diariamente nos 21 dias. Os dados representam a média \pm E.P.M. da temperatura articular em graus Celsius ($^{\circ}$ C). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, e One-way ANOVA, seguido do teste Tukey. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo MIA; ## indica significância estatística ($p < 0,01$) em relação ao grupo MIA na MB; ### indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo MIA na MB; e & indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo MIA no dia 11.

5.5 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO ARTICULAR DE JOELHO NA OA E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM US OU LASER

Assim como a variação na temperatura articular em decorrência da OA, o diâmetro articular de joelho também foi avaliado, com o intuito de investigar se, no presente modelo, a presença de edema poderia ser identificada com a progressão da doença. O gráfico 6 mostra os achados da avaliação do diâmetro articular por meio da paquimetria. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos e nenhuma variação significativa ao longo do período de avaliação, demonstrando que, no presente modelo, não houve presença de edema que alterasse o diâmetro articular, em decorrência do desenvolvimento da OA.

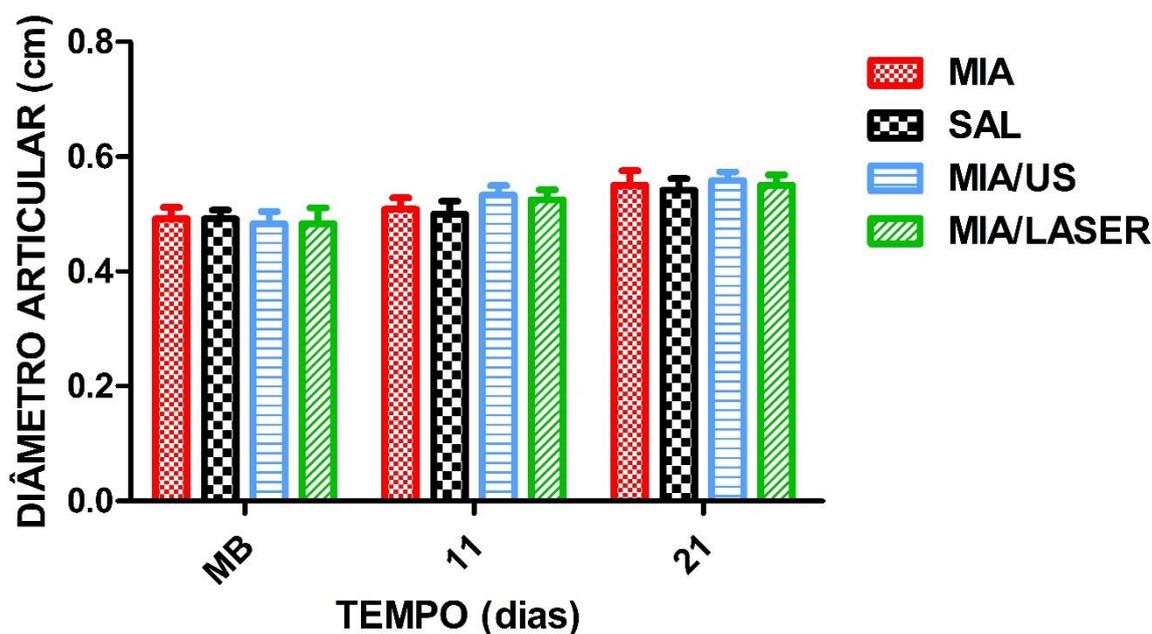


Gráfico 6 - avaliação do diâmetro articular do joelho direito dos animais e a influência do tratamento com US ou LASER no diâmetro articular, obtida por meio de paquimetria. Foi realizada inicialmente uma medida basal (MB) do diâmetro articular antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB), e então nos dias 11 e 21 após a injeção, sendo que o tratamento com US ou LASER foi realizado diariamente nos 21 dias. Os dados representam a média \pm E.P.M. do diâmetro articular em centímetro (cm). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, e One-way ANOVA, seguido do teste Tukey. Não foi observada diferença estatística entre os grupos.

5.6 AVALIAÇÃO DA MARCHA DURANTE A OA E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM US OU LASER

Para investigar se a nocicepção previamente avaliada poderia interferir funcionalmente na mobilidade dos animais no presente modelo de OA, foi realizada a análise da marcha dos animais por meio de análise de vídeo. Primeiramente, a marcha foi avaliada lateralmente, no plano sagital dos animais, para que o ângulo articular do joelho direito dos animais pudesse ser avaliado. Sendo assim, o gráfico 7 exibe a avaliação da angulação articular relacionada à amplitude do joelho direito dos animais durante a fase de apoio médio desse membro. No dia 21, os animais que receberam MIA i.a. tratados com US (MIA/US) apresentaram uma amplitude significativamente maior ($p < 0,01$) durante a fase de apoio em relação aos animais não tratados (MIA), o que não foi encontrado em relação aos animais que receberam MIA i.a. tratados com LASER (MIA/LASER).

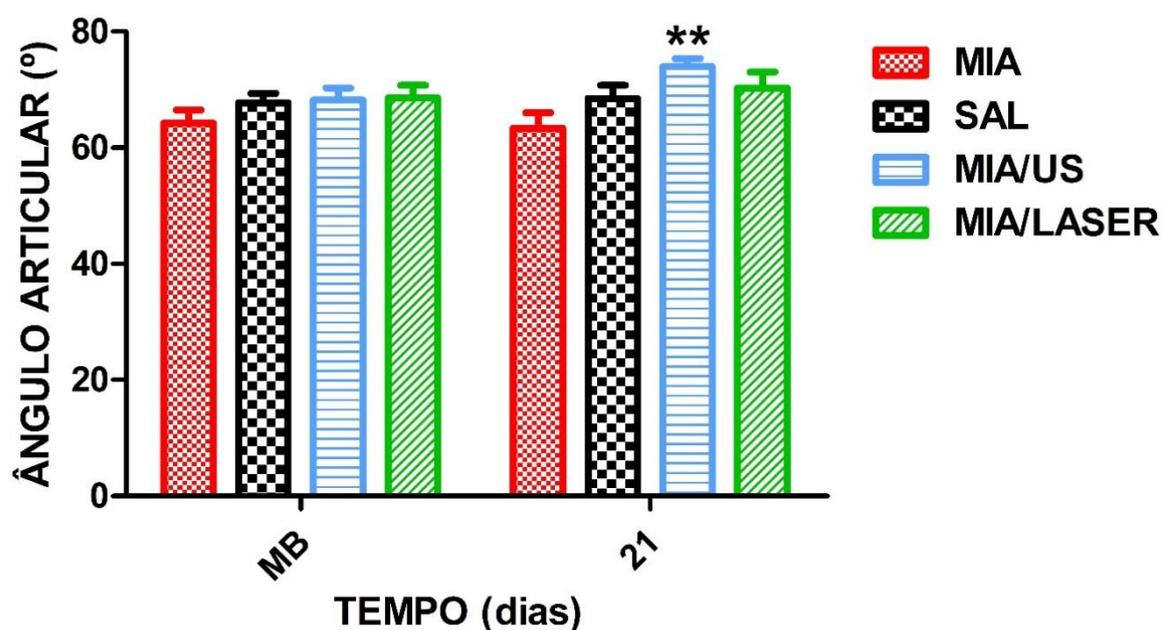


Gráfico 7 – avaliação dos ângulos articulares do joelho do membro posterior direito, obtida por meio da análise da marcha capturada em vídeo. Foi realizada inicialmente uma captura de vídeo basal (MB) da marcha antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB), e então 21 após a injeção, sendo que o tratamento com US ou LASER foi realizado diariamente nos 21 dias. Os dados representam a média \pm E.P.M. do ângulo articular em graus ($^{\circ}$). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, e One-way ANOVA, seguido do teste Tukey. ** representa diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre os grupos MIA e MIA/US.

Foi analisada também se a OA teve influência sobre superfície de apoio plantar da pata no lado afetado, por meio da avaliação da marcha na vista inferior. O gráfico 8 representa a área da pata direita dos animais durante a fase de apoio médio do membro em questão. Nesse caso, é possível notar que não houve variação estatisticamente significativa da área plantar entre os grupos ou entre os tempos avaliados.

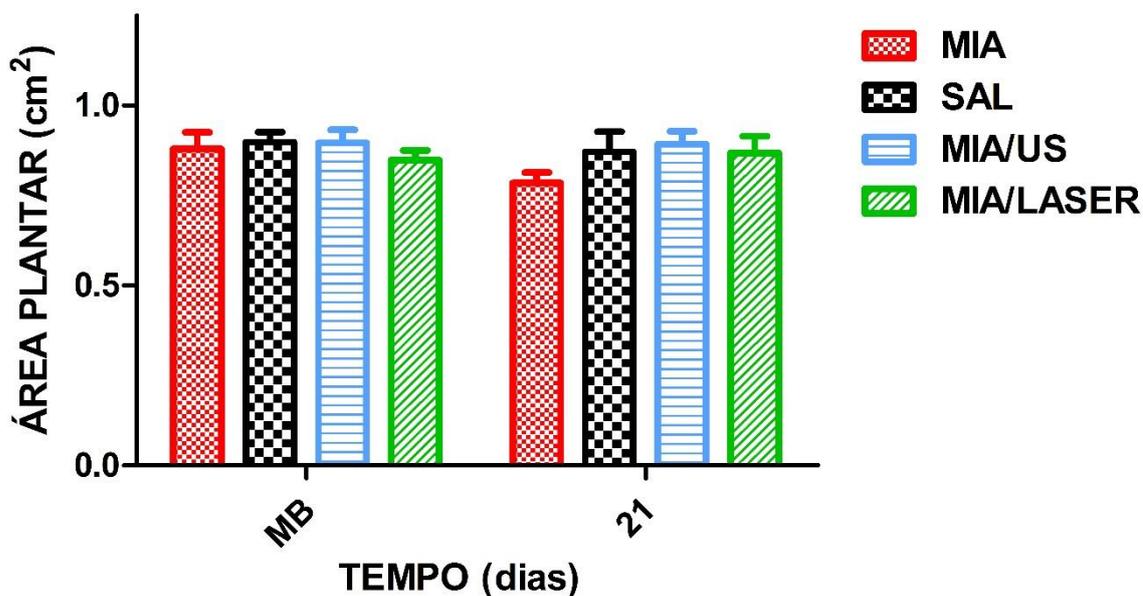


Gráfico 8 – avaliação da área plantar da pata posterior direita dos animais, obtida por meio da análise da marcha capturada em vídeo. Foi realizada inicialmente uma captura de vídeo basal (MB) da marcha antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB), e então 21 após a injeção, sendo que o tratamento com US ou LASER foi realizado diariamente nos 21 dias. Os dados representam a média \pm E.P.M. da área da pata em centímetros quadrados (cm²). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, e One-way ANOVA, seguido do teste Tukey. Não foi observada diferença estatística entre os grupos.

5.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA OA E A INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE US E LASER

Embora o modelo de OA utilizado no presente estudo tenha sido bastante utilizado na literatura, foi realizada uma análise histológica qualitativa do tecido articular, em especial da cartilagem articular, com o objetivo de averiguar e confirmar a presença de lesão como consequência da OA.

A figura 17 mostra imagens representativas de cortes histológicos de animais de quatro grupos: animais que receberam MIA i.a. (MIA), animais que receberam salina i.a. (SAL), animais que receberam MIA i.a. tratados com US (MIA/US) e animais que receberam MIA i.a. tratados com LASER (MIA/LASER).

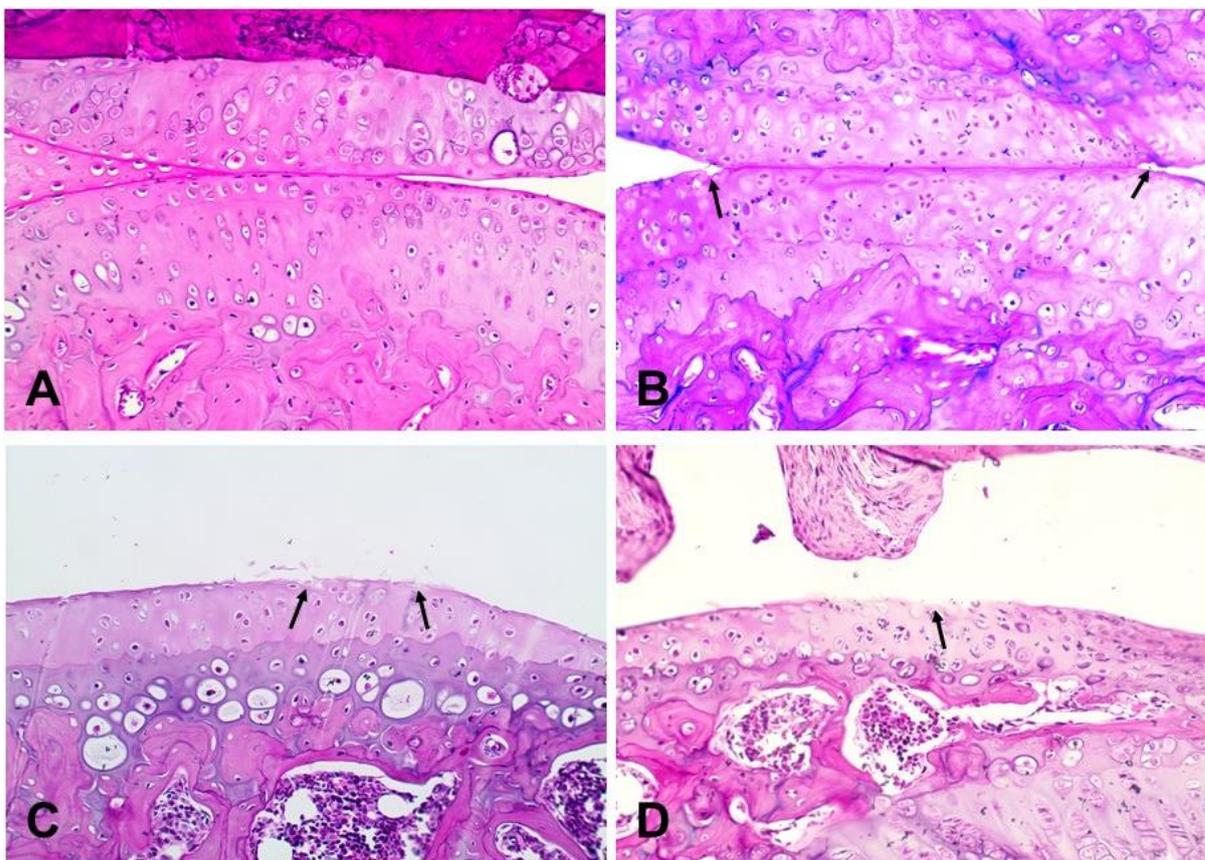


Figura 15 – imagens histológicas da articulação posterior direita dos animais obtidas por meio de microscopia (20x).

Nota: A: grupo SAL; B: grupo MIA; C: grupo MIA/US; D: grupo MIA/LASER.

As setas pretas apontam locais em que se percebe lesão da cartilagem hialina articular.

De acordo com as imagens obtidas, os animais do grupo SAL (figura 15 A) apresentaram a cartilagem articular íntegra, com a superfície contínua, sem sinais aparentes de lesão cartilaginosa relacionada à OA. Por outro lado, os animais do grupo MIA (figura 15 B) exibiram pontos de fissura e fibrilação na cartilagem articular, indicando perda da continuidade articular e lesão de tecido cartilaginoso. O mesmo pôde ser notado nos animais dos grupos MIA/US (figura 15 C) e MIA/LASER (figura 15 D). Apesar de terem sido tratados com os recursos fisioterapêuticos, o surgimento de lesões na superfície cartilaginosa não foi impedido pelo tratamento.

5.8 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA OA

Com o objetivo de confirmar os achados da literatura de que as células da glia espinais podem participar da nocicepção induzida pela OA, foi conduzido um ensaio farmacológico para investigar a participação de astrócitos e micróglia espinais no presente modelo de OA.

Primeiramente, no 10º dia após a injeção i.a. de MIA ou salina, os animais receberam uma injeção por via intratecal do inibidor de micróglia, a minociclina, em duas diferentes doses (30 ou 60 ng) ou seu veículo. O 10º dia foi escolhido para conduzir este experimento pois foi o dia que mais apresentou nocicepção, como observado nos 21 dias de avaliação (gráfico 1). O gráfico 9 mostra o limiar nociceptivo mecânico dos animais, avaliado 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a injeção i.t. de minociclina ou veículo. De acordo com os resultados, observa-se que os animais que receberam MIA i.a. e veículo por via i.t. (MIA/Vec) demonstraram uma queda significativa ($p < 0,01$ no sétimo dia; $p < 0,001$ nos demais tempos; $f_{4,28} = 4,888$), do limiar nociceptivo mecânico em todos os tempos avaliados em relação aos animais que receberam salina i.a. e veículo i.t. (SAL/Vec). Em relação aos animais do grupo SAL/Vec, houve também redução significativa do limiar nociceptivo dos animais que receberam MIA i.a. e a dose de 60 ng i.t. (MIA/Mino 60 ng) na 1ª, 5ª ($p < 0,05$), 7ª ($p < 0,01$) e 24ª ($p < 0,001$) hora após a injeção da droga. Houve também redução do limiar nociceptivo dos animais que receberam a menor dose de minociclina (MIA/Mino 30 ng) e os animais do grupo SAL/Vec na 1ª ($p < 0,01$), 3ª ($p < 0,001$), 5ª ($p < 0,01$) e 24ª ($p < 0,001$) hora após a injeção. Os animais que receberam salina i.a. e minociclina i.t. (SAL/Mino) não apresentaram variação do limiar nociceptivo basal. Entretanto, os animais de grupo MIA/Mino 60 ng exibiram uma reversão da nocicepção na 3ª hora ($p < 0,001$; $f_{4,28} = 4,888$) e uma atenuação da nocicepção na 5ª hora ($p < 0,01$; $f_{4,28} = 4,888$) em relação aos animais MIA/Vec, retornando à nocicepção a partir da 7ª hora. Além disso, os animais do grupo MIA/Mino 30 ng apresentaram resultado similar, porém menos potente, resultando em uma atenuação significativa da nocicepção induzida pela OA na 5ª ($p < 0,01$; $f_{4,28} = 4,888$) e na 7ª hora ($p < 0,05$; $f_{4,28} = 4,888$), retornando à nocicepção a partir de então. Esses resultados sugerem que a micróglia está possivelmente envolvida com a nocicepção causada pela OA induzida por MIA, uma vez que sua inibição atenuou a nocicepção de maneira dose dependente.

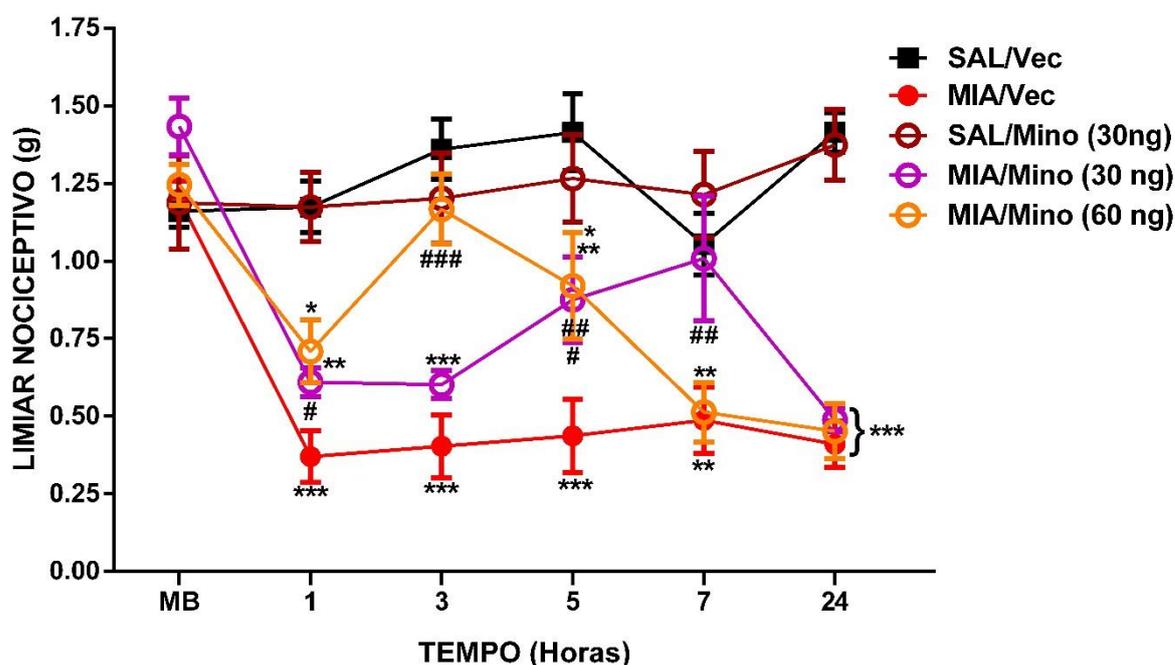


Gráfico 9 - avaliação do envolvimento da micróglia espinal na nocicepção associada à osteoartrite induzida por MIA. Foi realizada uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB) e depois 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a injeção i.t. de minociclina (30 ou 60 ng) ou veículo. Os dados representam a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. * indica significância estatística ($p < 0,05$); ** indica significância estatística ($p < 0,01$); e *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL/Vec. # indica significância estatística ($p < 0,05$); ## indica significância estatística ($p < 0,01$) em relação ao grupo MIA/Vec.

De forma similar ao experimento anteriormente descrito, animais que receberam MIA ou salina i.a. receberam uma injeção por via i.t. do inibidor de astrócitos, o fluorocitrato, em duas diferentes doses (150 ou 300 pmol) ou seu veículo, com o intuito de investigar a possível participação desse tipo de célula da glia na nocicepção induzida pela OA. Com base nos resultados demonstrados no gráfico 10, os animais que receberam MIA i.a. e veículo i.a. (MIA/Vec) tiveram uma queda no limiar nociceptivo mecânico significativa em todos os tempos avaliados, em relação aos animais que receberam salina i.a. e veículo i.t. (SAL/Vec). Foi observada redução do limiar nociceptivo dos animais que receberam MIA i.a. e a maior dose de fluorocitrato (MIA/Fluo 300 nmol) apenas na 7^a após a injeção ($p < 0,01$) em relação aos animais SAL/Vec, enquanto os animais que receberam a menor dose (MIA/Fluo 150 pmol) demonstraram redução no limiar na 5^a e na 7^a hora ($p < 0,01$). Como esperado, os animais que receberam salina i.a. e fluorocitrato i.t. (SAL/Fluo) não apresentaram alteração do limiar nociceptivo mecânico basal. Todavia, os animais do grupo MIA/Fluo 300 pmol apresentaram uma atenuação significativa da nocicepção

induzida pela OA na 5ª ($p < 0,01$; $f_{4,28} = 1,913$) e na 7ª ($p < 0,01$; $f_{4,28} = 1,913$). Os animais do grupo MIA/Fluo 150 pmol, por sua vez, demonstraram apenas uma atenuação da nocicepção induzida pela OA na 5ª hora ($p < 0,05$; $f_{4,28} = 1,913$). Tais achados permitem sugerir que os astrócitos espinais podem estar envolvidos com a nocicepção induzida pela OA, uma vez que a sua inibição, de forma dose dependente, foi capaz de atenuar a nocicepção causada pela OA induzida por MIA.

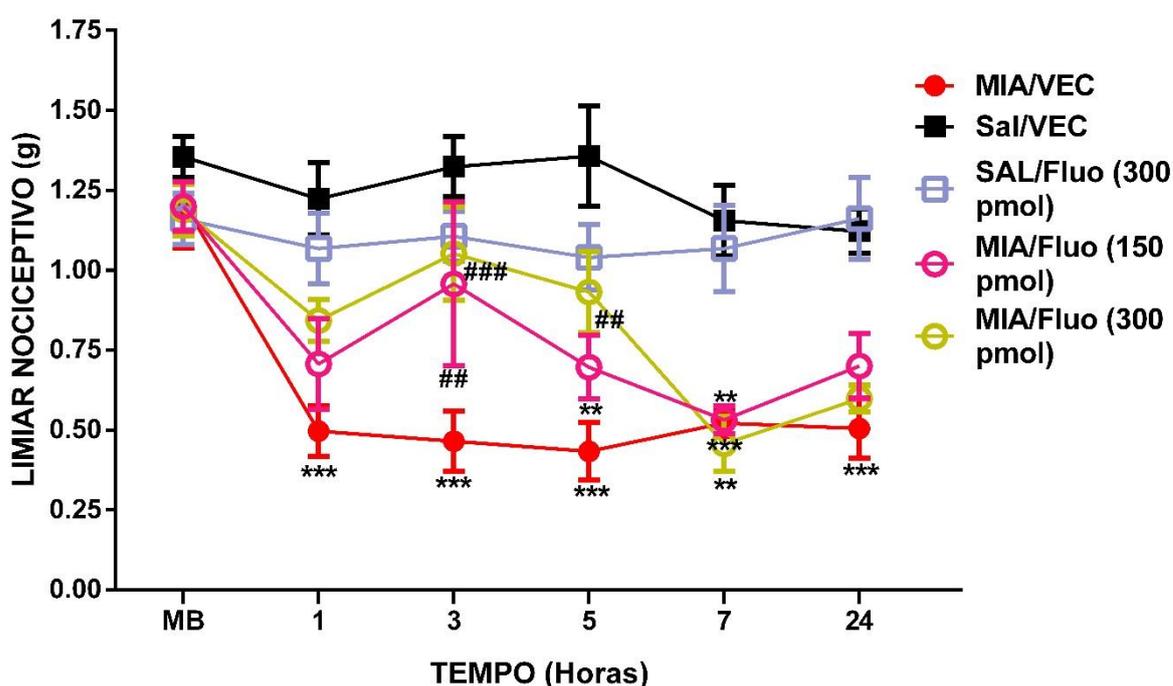


Gráfico 10 - avaliação do envolvimento dos astrócitos espinais na nocicepção associada à OA induzida por MIA. Foi realizada uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo antes da injeção i.a. de MIA (0,1 mg) ou salina (MB) e depois 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a injeção i.t. de fluorocitrato (150 ou 300 pmol) ou veículo. Os dados representam a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. * indica significância estatística ($p < 0,05$); ** indica significância estatística ($p < 0,01$); e *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SAL. ## indica significância estatística ($p < 0,01$); ### indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo MIA.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que o tratamento diário com US e LASER foi capaz de reverter a nocicepção induzida pela OA, no entanto não teve influência aparente em achados clínicos como a temperatura articular, diâmetro articulares e a marcha dos animais avaliados. A investigação da participação das células da glia na

nocicepção induzida pela OA revelou que tanto micróglia como astrócitos espinais parecem estar envolvidos.

O estudo foi iniciado com um experimento para validar o modelo de nocicepção induzida por OA por meio da injeção i.a. de MIA, como descrito por Pitcher e colaboradores (2016). Os achados mostraram que o modelo foi capaz de promover nocicepção do 3º até o 21º dia, apesar de a dose de MIA utilizada no presente estudo (0,1 mg) ter sido menor do que a utilizada por Pitcher. No trabalho de Pitcher, a menor dose de MIA, que foi de 0,5 mg, promoveu nocicepção em relação ao grupo controle apenas no 10º e 28º dia após a injeção, em contraste com o encontrado no presente estudo. No entanto, a maior dose utilizada por Pitcher, 1,0 mg, promoveu nocicepção do 5º ao 28º dia após a injeção, de forma similar ao apresentado pelos achados do presente estudo. Ogonna e colaboradores (2013) utilizaram também as doses de 0,5 e 1,0 mg de MIA por via i.a. para induzir OA em camundongos, e, da mesma forma, observaram nocicepção começando a partir do 7º e 5º dia, respectivamente, com duração até o 28º dia. Já o estudo de Nwosu e colaboradores (2016) investigou o efeito da injeção i.a. de 0,1 mg de MIA, assim como no presente estudo. Os achados do presente estudo corroboram com os de Nwosu, que encontrou nocicepção do 3º ao 20º dia após a injeção, porém o estudo foi realizado com ratos. Dessa maneira, o presente modelo foi capaz de reproduzir comportamento nociceptivo nos animais, uma vez que o MIA em roedores promove alterações articulares condizentes com aquelas encontradas na OA em humanos (GUZMAN et al., 2003a; VAN DER KRAAN et al., 1989)

Do ponto de vista histológico, foram encontradas alterações estruturais patológicas da cartilagem articular no modelo investigado. Vinte e um dias após a injeção de MIA, os animais apresentaram regiões de fissura e fibrilação superficial da cartilagem hialina articular. Guzman e colaboradores (2003) verificaram que, no intervalo de tempo entre o 14º e o 28º dia após a injeção i.a. de 1,0 mg de MIA, não apenas alterações de cartilagem ocorreram, mas também alterações patológicas no osso subcondral. Alterações no osso subcondral não foram encontradas nos animais do presente estudo, mas isso pode refletir o fato de ter sido utilizada uma dose bem menor (0,1 mg) do que a de Guzman, fazendo com que a progressão da patologia seja mais lenta. Udo e colaboradores (2016) investigaram o efeito da injeção de 0,1 mg de MIA i.a. macroscópica e histologicamente. Foi visto que, nos animais que receberam 0,1 mg de MIA, houve depressões pontuais na cartilagem articular por volta

de 4 semanas e erosão articular após 6 semanas da injeção. Os resultados mostrados pelo presente estudo discordam dos demonstrados por Udo, uma vez que fibrilação e perda de continuidade da cartilagem foram observadas com apenas 21 dias. Entretanto, cabe salientar que o estudo de Udo foi realizado em ratos. Considerando que o MIA é uma droga que promove seus efeitos por alterações metabólicas (VAN DER KRAAN et al., 1989), o diferente metabolismo entre ratos e camundongos talvez possa influenciar a taxa de progressão da patologia. Estudos consideram que a OA induzida por MIA seja dose e tempo dependente (TAKAHASHI et al., 2018; UDO et al., 2016), e que a dose máxima a ser considerada é de 1,0 mg (PITCHER; SOUSA-VALENTE; MALCANGIO, 2016; UDO et al., 2016). Embora o presente estudo tenha utilizado uma dose considerada baixa (0,1 mg), alterações histológicas correspondentes ao comportamento nociceptivo demonstrado pelos animais foram identificadas, caracterizando a validade do modelo de dor aplicado. Porém, essas alterações limitaram-se apenas às zonas superficiais da cartilagem, não afetando diretamente a cartilagem profunda ou o osso subcondral. Com isso, pode ser inferido que se trata de um modelo de OA precoce, em um estado mais inicial da progressão.

A utilização do ultrassom terapêutico de baixa intensidade no tratamento de distúrbios musculoesqueléticos tem sido descrita na literatura. Considera-se de baixa intensidade a utilização de intensidades abaixo de 3 W/cm^2 (LEONG et al., 2013), sendo empregada na prática fisioterapêutica primariamente para estimular a proliferação celular e reparo tecidual (TER HAAR, 2007). Embora os ensaios clínicos envolvendo US com foco na manutenção da OA reportarem parâmetros bastante divergentes, resultados demonstram que a terapia com US tende à redução da dor e melhora percebida da funcionalidade (LOYOLA-SÁNCHEZ; RICHARDSON; MACINTYRE, 2010).

Em relação aos recursos fisioterapêuticos, os achados deste estudo apontam que o US foi capaz de promover antinocicepção tardia quando aplicado diariamente, e a duração da antinocicepção de uma única aplicação foi de uma hora. No presente estudo, a forma contínua do US foi utilizada para o tratamento da OA. Zeng e colaboradores (2014) revisaram a literatura comparando a efetividade do ultrassom pulsado ou contínuo no tratamento da OA. Eles concluíram que tanto o US contínuo como o pulsado aparentam ser eficazes na redução da dor, embora exista uma tendência na escolha do pulsado em relação ao contínuo. Zeng discute que o US contínuo, ao contrário do US pulsado, pode gerar um leve aquecimento tecidual, o que

pode ser benéfico no aumento do metabolismo, permeabilidade capilar, extensibilidade do tecido fibroso e elevar o limiar nociceptivo. Em razão disso, o US contínuo foi escolhido como uma das formas de tratamento da OA no nosso trabalho.

Estudos até o momento ainda não demonstraram, em longo prazo, o efeito antinociceptivo do US em modelos animais de OA. Em outros modelos de dor, entretanto, os efeitos antinociceptivos do US têm sido avaliados. Hung e colaboradores (2016) verificaram que o tratamento por 5 minutos, em 5 dias na semana, por 4 semanas com US pulsado a 20%, frequência de 1 Mhz e intensidade de 1 W/cm^2 atenuou a dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático (CCI) em ratos do 3º ao 28º dia após a constrição. Além disso, os autores também relataram redução nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, assim como uma infrarregulação da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (Iba1) na medula espinal. Nossos achados corroboram com os de Hung, uma vez que também foi encontrada antinocicepção com aplicação de US. No entanto, em discordância com o resultado de Hung, no presente estudo o tratamento diário com US contínuo promoveu analgesia apenas a partir do 14º dia. Isso pode ser explicado por diferenças nos parâmetros de US, por ser um outro modelo nociceptivo avaliado ou pela distribuição distinta dos tratamentos ao longo dos dias.

Chen e colaboradores (2015) testaram o efeito antinociceptivo do US contínuo, com frequência de 1 Mhz nas intensidades de 0,25, 0,5 e 1 W/cm^2 , em um modelo de CCI em ratos e identificou que a aplicação por 5 dias na semana ao longo de 28 dias da dose de 1 W/cm^2 promoveu a maior atenuação da alodínia mecânica e da hiperalgesia. Essa intensidade também foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 e TNF- α e a expressão de Sub P e do seu receptor, neurocinina do tipo 1 (NK-1R), os quais estão envolvidos na resposta nociceptiva, na região do nervo constricto. Em concordância com o estudo de Chen, no presente estudo a intensidade utilizada de 1 W/cm^2 foi eficaz em promover analgesia. Todavia, os nossos resultados mostram antinocicepção a partir do 14º dia de tratamento, em contraste com o estudo de Chen que reportou analgesia a partir do 7º dia. Portanto, os achados do presente estudo apontam que o US foi eficaz ao promover antinocicepção quando aplicado diariamente, e esses achados podem ser sustentados pelos estudos de Hung e colaboradores (2016) e Chen e colaboradores (2015), que encontraram antinocicepção similar, diferindo apenas no período de manifestação desse efeito.

Vale notar que esses estudos utilizaram um modelo de dor neuropática, enquanto o nosso foi de nocicepção induzida por OA, o que pode influenciar os resultados terapêuticos observados, mesmo com a utilização de uma metodologia parecida de tratamento com US.

A duração do efeito antinociceptivo de um único tratamento com o US foi investigada em um estudo com dor articular induzida pela injeção i.a. de formalina 5%, um agente nociceptivo (CORADINI et al., 2014). Coradini e colaboradores (2014) reportaram que, 45 minutos após o tratamento com US contínuo, houve reversão parcial da nocicepção induzida pela formalina. No presente estudo, a antinocicepção induzida pelo US teve duração de 60 minutos, de forma similar aos achados de Coradini. Bertolini e colaboradores (2014), utilizando o mesmo modelo de Coradini, comparou os efeitos antinociceptivos do US pulsado e do US contínuo, e verificou que ambos tiveram efeito antinociceptivo com 45 minutos de aplicação. Estes estudos, entretanto, não avaliaram o efeito do tratamento com US por mais que 45 minutos, não oferecendo dados complementares para estabelecer uma comparação do limiar nociceptivo em tempos a partir de 60 minutos de tratamento. O efeito antinociceptivo do US também foi investigado em um modelo de dor crônica induzida por toracotomia em ratos (LIU; HUNG, 2015). Foi verificado que o tratamento com US pulsado a 20%, com frequência de 1 Mhz e intensidade de 1 W/cm², teve maior efetividade na reversão da alodínia mecânica no período avaliado de 24 horas, embora a modalidade contínua com a mesma intensidade também tenha conseguido atenuar a alodínia. Nossos achados suportam o resultado e Liu e Hung (2015) pois, assim como Liu, foi encontrado efeito antinociceptivo do US contínuo imediatamente após a sua aplicação no nosso estudo. Porém, Liu não especificou os tempos avaliados nessas 24 horas, tornando difícil a comparação dos resultados.

Os resultados do presente estudo a respeito da antinocicepção provocada pelo tratamento com o US, apesar de corroborar com os achados da literatura com virtude à capacidade de promover antinocicepção, divergem em relação ao resultado terapêutico em alguns aspectos, principalmente em relação ao período de manifestação da antinocicepção. Embora na maioria dos casos isso possa ser atribuído a fatores já mencionados, outra fonte de variabilidade entra em questão: a fonte das ondas ultrassônicas. Segundo Straub (2008), é notório que existe variabilidade entre transdutores de diferentes unidades de ultrassom. A preocupação é que diferenças na intensidade média espacial (IME) – a relação entre a potência

máxima emitida pelo transdutor e a ERA – podem interferir nos resultados terapêuticos obtidos (STRAUB; JOHNS; HOWARD, 2008), mesmo utilizando parâmetros iguais ou próximos. Portanto, a utilização de diferentes unidades de US com diferentes especificações de transdutor pode proporcionar variabilidade nos achados.

Acredita-se que a interface de acoplamento também pode ter influência nos resultados terapêuticos. A maioria dos estudos citados utilizaram gel como meio acoplador (CHEN et al., 2015; CHUNG; MIN; BAIK, 2016; HUNG et al., 2016). Embora a água tenha sido utilizada no presente estudo como meio acoplador, relatos demonstram que a diferença na capacidade de transmissão das ondas ultrassônicas entre água e gel é quase nula (CASAROTTO et al., 2004). Por tal motivo, justificou-se o uso da forma subaquática do US, e também em virtude da incompatibilidade de tamanho entre o transdutor disponível e a área irregular de aplicação na articulação do animal. Vale ressaltar que o presente estudo foi o único a empregar a utilização da modalidade subaquática do US no tratamento de um distúrbio musculoesquelético em camundongos.

O presente estudo, embasado em relatos da literatura, demonstrou que o US aplicado diariamente por 21 dias promoveu antinocicepção em animais com OA. A dor induzida pela OA é complexa, originando-se da coexistência de vários eventos que ocorrem nas articulações acometidas. Notoriamente, sabe-se que vários mediadores pró-inflamatórios são liberados na articulação durante o processo da OA, e esses mediadores não só estimulam e sensibilizam os nociceptores na articulação, mas também ativam uma série de enzimas catalíticas que destroem a cartilagem articular e perpetuam a patologia (LEONG et al., 2013). A literatura tem demonstrado que o tratamento com US tem a capacidade de modificar os sintomas na OA, dentre eles a dor e a funcionalidade. Heng e colaboradores (2016) e Chen e colaboradores (2015) demonstraram redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , tanto a nível central como periférico.

O tratamento com US também reduz a expressão de enzimas proteolíticas, especialmente metaloproteinases de matriz (MMP) do tipo 3 e 13 e de metaloproteinases com domínios de desintegrina e trombospondina (ADAMTS) (LEONG et al., 2013). As ADAMTS são uma família de agrecanases que degradam agrecana da cartilagem articular e a sua presença é um indicativo de degradação da cartilagem na OA (VERMA; DALAL, 2011). Além disso, Chung; Min e Baik (2016) indicaram que o tratamento com US de baixa intensidade também promove uma

modificação no perfil de ativação de macrófagos e neutrófilos durante a sinovite induzida por CFA, facilitando o *clearance* de neutrófilos e neutrófilos apoptóticos por parte de macrófagos fagocíticos. Neutrófilos são importantes peças na resposta imune, e seu acúmulo pode promover estados inflamatórios inapropriados. Considerando o descrito, sugere-se que a antinocicepção promovida pelo tratamento diário com US possa, em partes, ser atribuída às suas propriedades modulatórias sobre a inflamação.

É interessante notar que os achados do nosso estudo mostraram efeitos antinociceptivos do tratamento diário com US apenas do 14^o ao 21^o. Porém, um único tratamento com US no 14^o dia também promoveu antinocicepção com duração de uma hora. Possivelmente, diferentes mecanismos estão relacionados na antinocicepção induzida pelo US nesses dois casos. Como discutido acima, os efeitos em longo prazo podem ser explicados pelo controle inflamatório exercido pelo US. Os mecanismos de antinocicepção imediata, entretanto, não são tão elucidados. Acredita-se que o US consiga, devido às suas propriedades mecânicas e térmicas, alterar a excitabilidade e a capacidade de transmissão de potenciais em neurônios (TSUI; WANG; HUANG, 2005). O US também é capaz de promover um efeito denominado sonoporação, cujas características dinâmicas permitem a formação e fechamento de poros na membrana plasmática, podendo alterar o potencial de membrana celular (PAN et al., 2005). Portanto, tais mecanismos podem estar envolvidos com a antinocicepção imediata induzida pelo tratamento com US.

Considerando que o US pode atuar sobre os sintomas da OA, principalmente na dor e inflamação, ainda não está claro se o US pode ser considerado um recurso modificador da patologia. Embora apresente efeitos anabólicos e condroprotetores (LEONG et al., 2013; NAITO et al., 2010), o US pode retardar, mas não parar a progressão. As imagens histológicas do presente estudo mostram que, após 21 dias de tratamento com US, lesões superficiais na cartilagem articular foram identificadas nos animais tratados. Essas lesões assemelham-se às observadas nos animais que receberam MIA i.a. apenas. Naito e colaboradores (2010) demonstraram que o US de baixa intensidade atenuou a perda de cartilagem no 28^o dia, em um modelo de OA induzida pela lesão cirúrgica do ligamento cruzado anterior (LCA) e ressecção do menisco em ratos. Embora o achado histológico do presente estudo não esteja de acordo com o descrito por Naito, cabe salientar que, além do fato de os parâmetros utilizados em seu estudo terem sido diferentes, o modelo de indução da OA foi de

origem mecânica, e não química como no nosso estudo, o que também pode exercer influência sobre a forma como a patologia progride.

O outro recurso fisioterapêutico investigado neste estudo foi o LASER, uma forma de fotobiomodulação. Os nossos achados apontam que o LASER teve um efeito antinociceptivo substancial na nocicepção induzida pela OA, quando aplicado diariamente por 21 dias, e com antinocicepção que dura por volta de uma hora após uma única aplicação, similar ao visto no US.

Os estudos com LASER objetivando especificamente o controle da nocicepção em modelos animais de OA são especialmente mais escassos. O estudo de Micheli e colaboradores (2017) investigou o efeito do LASER na nocicepção em um modelo de OA induzida por MIA, artrite induzida por CFA e na dor neuropática induzida por CCI, todos eles em ratos. A unidade de laser foi composta de dois diodos sincronizados, emitindo radiação próxima do infravermelho nos comprimentos de onda de 808 nm e 905 nm. Os parâmetros utilizados foram: feixe pulsado com frequência de 30 Hz, com potência média de 125 mW, entregando 0,32 J/cm² por ponto durante 8 segundos. Foi feita a aplicação em dois pontos, sendo um na medial à patela e outro lateral à patela, assim como realizado no presente estudo. O tratamento foi aplicado durante 13 dias e iniciou-se no 14^o dia após a indução da nocicepção, diferentemente do presente estudo, que iniciou o tratamento no dia imediatamente após a indução do modelo de OA. No modelo de OA induzida por MIA, Micheli observou uma reversão da nocicepção avaliada por um analgesímetro de pressão durante todo o período de tratamento, assim como nos modelos de artrite induzida por CFA e dor neuropática induzida por CCI (MICHELI et al., 2017). O presente estudo encontrou atenuação da nocicepção na maior parte dos tempos de avaliação, notadamente nos dias 3, 10 e 14 após a indução de OA, achado similar ao do estudo de Micheli. Embora Micheli tenha verificado antinocicepção em todos os tempos avaliados durante os 13 dias, o presente estudo encontrou uma forte tendência antinociceptiva do tratamento com o LASER, mesmo nos dias em que o resultado não foi estatisticamente significativo em relação aos animais não tratados. Essa diferença no perfil antinociceptivo entre os resultados pode ser atribuída à característica pulsada do feixe e à menor densidade de energia empregado por Micheli.

Os efeitos antinociceptivos resultantes do tratamento diário com LASER encontrados no presente estudo podem ser derivados do controle da inflamação local. De uma forma geral, a literatura demonstra que a fotobiomodulação (FBM) reduz o

número de células inflamatórias e liberação de citocinas pró-inflamatórias em uma série de patologias, incluindo OA e a artrite reumatoide (COTLER et al., 2015). Um estudo por Kim e Kim (2013), avaliando os efeitos do LASER de 850 nm e densidade de energia de 3,6 J/cm² na OA induzida por MIA em ratos, relatou que os animais tratados tiveram menores níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Assis e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com LASER 803 nm promoveu efeitos condroprotetores na cartilagem de animais com OA induzida por lesão do LCA, atenuando a diminuição da espessura da cartilagem causada pela progressão da doença, e reduzindo os níveis de IL-1 β , caspase-3 e MMP-13 na cartilagem articular (ASSIS et al., 2016). A caspase-3 é descrita como um importante mediador de apoptose (PORTER; JÄNICKE, 1999). Sendo assim, o LASER pode prevenir a morte de condrócitos, a degradação da matriz cartilaginosa por enzimas catalíticas e reduzir a liberação de mediadores inflamatórios na região. Guo e colaboradores (2011), também em um modelo de OA induzido por lesão do LCA, observou efeitos benéficos da FBM com LASER de 810 nm, quando os animais foram tratados por 10 dias, 6 semanas após a indução da OA. Os níveis de caspase-3 e caspase-8 nos condrócitos da cartilagem dos animais tratados foram reduzidos, apesar de os níveis séricos de TNF- α não terem sido modificados. Com resultados similares, Wang e colaboradores (2014) encontraram menor nocicepção tardia em coelhos com OA induzida pela lesão do LCA, tratados com LASER contínuo de 830 nm. Além disso, os autores observaram um aumento na expressão de fatores anabólicos e redução de fatores catabólicos e mediadores pró-inflamatórios na cartilagem articular associados ao tratamento com LASER, o que resultou em maior preservação da cartilagem em relação aos animais não tratados. Pallota e colaboradores (2012) verificaram que o tratamento com LASER de 810 nm, com densidade de energia de 50 a 500 J/cm², promove redução na contagem total de leucócitos na região articular e redução nos níveis de mediadores pró-inflamatórios, dentre eles IL-1, IL-6, PGE₂ e mieloperoxidase (uma enzima que catalisa a reação de formação de espécies reativas na resposta inflamatória), 3 e 6 horas depois do tratamento.

A FBM pode regular vários processos biológicos, dentre eles a inflamação. Por exemplo, o LASER pode limitar a ativação de um fator de transcrição importante na liberação de mediadores inflamatórios: o NF- κ B (FREITAS; HAMBLIN, 2016). Assim, a produção e liberação de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e outros mediadores resultantes da ativação do NF- κ B pode ser reduzida pelo tratamento com

LASER, exercendo dessa forma efeitos modulatórios sobre a inflamação. Portanto, considerando as evidências acima expostas, propõe-se que a modulação da inflamação seja um dos mecanismos pelo qual o tratamento diário com LASER promove antinocicepção na OA seja.

Outro achado interessante do estudo de Micheli e colaboradores (2017) foi que o efeito antinociceptivo do tratamento com o LASER foi maior 30 minutos após o tratamento. No nosso estudo, o tratamento com LASER promoveu antinocicepção que durou 60 minutos. O efeito antinociceptivo prolongado do tratamento com o LASER observado no presente estudo pode ser justificado pela densidade de energia consideravelmente maior oferecida aos animais, em relação ao relatado por Micheli.

Coradini e colaboradores (2015) também demonstraram a duração do efeito antinociceptivo do tratamento com LASER de 830 nm, com densidade de 8 J/cm², na nocicepção induzida pela injeção i.a. de formalina 5%. Foi observado que o pico do efeito antinociceptivo do LASER foi aos 30 minutos após a aplicação, no entanto os autores não reportaram a avaliação de mais tempos após 30 minutos de tratamento. No nosso estudo, a duração do efeito foi de 60 minutos, retornando à nocicepção na terceira hora. Os achados do presente estudo apontam uma maior duração no efeito antinociceptivo do LASER em relação ao estudo citado. Apesar de Coradini e colaboradores (2015) terem utilizado os mesmos parâmetros, foi realizada a aplicação do LASER em apenas um ponto, resultando em uma menor dose total em comparação com o presente estudo. Outro fator determinante é o diferente modelo utilizado, que representa um modelo de nocicepção mais aguda, enquanto o nosso envolve nocicepção crônica.

A literatura relata que os efeitos analgésicos imediatos da FBM tem duração de alguns minutos, podendo ser justificado pelo bloqueio neuronal advindo da alteração no metabolismo dos neurônios nociceptivos, que resulta da alteração no potencial da membrana mitocondrial e redução inicial de produção de ATP (COTLER et al., 2015). Dessa forma, mecanismos intracelulares associados com a dor são interrompidos ou atrasados (CHOW; DAVID; ARMATI, 2007), podendo influenciar na transmissão de impulsos nociceptivos. Em curto e médio prazo, esse bloqueio neuronal de nociceptores resulta em menor ativação de neurônios de projeção nociceptivos, modulando assim a liberação de neurotransmissores excitatórios e, conseqüentemente, atividade na via nociceptiva (COTLER et al., 2015). CHOW e colaboradores (2011), em uma extensa revisão da literatura sobre os efeitos inibitórios

da FBM em nervos periféricos, levantaram dados interessantes envolvendo relatos de inibição temporária da condução ou ativação específica de nociceptores em diversos modelos animais de nocicepção. Eles viram que a irradiação com LASER pode reduzir tanto a amplitude como a velocidade de condução de potenciais de ação. Além disso, o LASER pode suprimir potenciais de ação evocados por estímulos nocivos e retardar o fluxo axonal por perturbações dos microtúbulos. Com isso, é possível sugerir que o efeito antinociceptivo reportado logo após o tratamento com LASER no presente estudo pode estar relacionado com a atuação do LASER diretamente sobre os nociceptores periféricos.

Nenhum estudo avaliou histologicamente a progressão da OA induzida por MIA em na articulação do joelho de roedores tratados com LASER. Wang e colaboradores (2014), no entanto, reportaram que, por mais que o tratamento com LASER na OA induzida por lesão do LCA em coelhos tenha atenuado a nocicepção e melhorado o equilíbrio entre fatores anabólicos e catabólicos na cartilagem, a progressão da patologia foi retardada, mas o dano cartilaginoso não foi impedido. Memis; Candirli e Kerimoglu (2018) avaliaram o efeito do tratamento com LASER de 940 nm, com densidade de energia de 15 J/cm^2 , na OA induzida por MIA da articulação temporomandibular (ATM) de coelhos. Nos achados histológicos, os autores encontraram mais tecido sadio nas articulações tratadas em relação aos animais não tratados, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Eles discutiram que o LASER atua na inflamação pela produção de mediadores anti-inflamatórios, porém o tempo necessário até que o LASER possa promover a liberação desses mediadores pode ser incompatível com a taxa de destruição tecidual pela inflamação vigente. No presente estudo, indícios de fibrilação superficial da cartilagem articular foram encontrados nos animais tratados com LASER 21 dias após a indução da OA, em conformidade com os resultados de Memis.

A termografia é uma técnica não invasiva que permite avaliar a temperatura da superfície da pele de forma rápida, econômica e que não oferece qualquer risco ou desconforto para o paciente (JAIRAM; MANISHA, 2016). Considerando que a inflamação faz parte do processo patológico da OA e o aumento na temperatura é um dos sinais clássicos da inflamação, articulações relativamente superficiais, como as da mão e do joelho, podem ser avaliadas por meio da temperatura da superfície da pele no local. Varjú e colaboradores (2004), correlacionando a temperatura obtida por termografia e achados radiológicos de pacientes com OA das articulações

metacarpofalângicas, interfalângicas proximais e distais, verificou que existe uma relação inversamente proporcional: temperaturas mais altas foram encontradas nas articulações que apresentaram achados radiológicos compatíveis com OA inicial, enquanto achados radiológicos de OA mais severa foram relacionados com menor temperatura articular. Por outro lado, Denoble e colaboradores (2010) viram que, ao avaliar a relação entre a temperatura superficial na região da patela e a severidade da OA de joelho em achados radiológicos, existe uma relação entre maiores temperaturas e maior severidade da OA de joelho.

Em um modelo animal de artrite induzida pela injeção i.a. de CFA no tornozelo, Brenner (2006) investigou a temperatura articular em um período de 6 horas até 7 dias em 3 diferentes linhagens de ratos, e comparou os dados de temperatura articular com outros parâmetros clínicos, incluindo diâmetro articular e o escore de severidade da artrite. Foram observados o aumento da temperatura articular e o grau de severidade da artrite, principalmente no período inicial, e esse aumento temperatura na artrite mostrou uma correlação com o aumento do grau de severidade da doença e do diâmetro articular dos animais. Os nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo da temperatura articular no 11^o e 21^o dia nos animais que receberam MIA i.a, em relação aos valores basais. Embora os animais do grupo MIA tenham apresentado uma temperatura mais baixa na medida basal, sendo significativamente mais baixa que os demais grupos, houve também um aumento significativo da temperatura do 21^o dia em relação 11^o dia nesse grupo, o que não ocorreu nos demais grupos. Isso pode indicar que, com a progressão da patologia, há o aumento da temperatura articular. No grupo controle e nos grupos tratados com US e LASER, não houve esse aumento, indicando que o tratamento pode ter impedido ou retardado o incremento da temperatura articular. Como já mencionado anteriormente, os efeitos anti-inflamatórios tanto do US como do LASER estão bem descritos, e embora ambos possam ter efeitos térmicos durante e brevemente após a aplicação, dependendo dos parâmetros utilizados, acredita-se que em longo prazo esses recursos atuam controlando a inflamação e, conseqüentemente, retardando o aumento da temperatura articular.

O edema é um sinal clínico que também pode ser relatado por pacientes com OA. Como um dos pilares da inflamação, o edema resulta do extravasamento de líquido dos vasos para o interstício, juntamente com o recrutamento de células inflamatórias para o local lesado. Estudos prévios mostraram que ratos injetados com

MIA por via i.a. apresentaram edema ou aumento do diâmetro articular. Por exemplo, Jimbo e colaboradores (2017), utilizando um paquímetro digital, reportaram que a injeção i.a. de 1,0 mg de MIA provocou um aumento do diâmetro anteroposterior e mediolateral do joelho de ratos do 7º ao 28º dia após a injeção. Similarmente, (Al-Saffar e colaboradores (2009), com uma dose ainda maior de 3,0 mg de MIA, demonstrou edema e maiores diâmetros articulares comparados aos animais controle especialmente entre os dias 7 e 10 após a injeção. O presente estudo não observou variações no diâmetro articular entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados, ou ainda nenhuma diferença nos mesmos grupos em diferentes tempos de avaliação, discordando dos resultados apresentados acima. O principal fator que pode ter influenciado tal achado é a dose de MIA utilizada. Nota-se que as doses utilizadas por Jimbo e Al-Saffar foram, respectivamente, 10 e 30 vezes maiores que a utilizada pelo nosso estudo, mesmo considerando que os estudos desses autores foram conduzidos em ratos. Estágios iniciais da OA normalmente apresentam edema restrito à cartilagem articular, fibrilação, perda focal de porções superficiais da cartilagem e presença de fissuras verticais na cartilagem. Nas fases iniciais, o sintoma mais relatado é a dor. (FAVERO et al., 2015). O nosso estudo identificou histologicamente lesões na cartilagem condizentes com estágios iniciais da OA, acompanhadas de nocicepção, porém não encontrou edema. Sendo assim, a dose de MIA utilizada no presente estudo pode ser utilizada para estudar estágios iniciais da patologia da OA, oferecendo a oportunidade de abordar a doença em um estágio mais precoce de desenvolvimento.

Relatos apontam o efeito do LASER na melhora da microcirculação local, resultando em melhor oxigenação tecidual e redução do edema (FUKUDA et al., 2011; HEGEDUS et al., 2009). O US também tem sido mencionado no controle do edema (JOHNS, 2002; RUTJES et al., 2010). Todavia, no presente estudo os recursos não influenciaram o diâmetro articular. Levando em conta que o modelo de OA inicial utilizado no presente estudo não causou edema, a capacidade de reduzir edema dos recursos fisioterapêuticos utilizados tornou-se irrelevante, e, portanto, não houve diferença entre os grupos tratados e não tratados.

Em articulações que sustentam a massa corporal, o joelho é a articulação mais afetada pela OA, e isso está intimamente relacionado com as atividades desempenhadas pelo indivíduo no dia a dia (FAVRE; JOLLES, 2016). Com a progressão da OA, alterações de parâmetros espaciais e temporais na marcha

secundárias à patologia tendem a surgir, como por exemplo a redução na velocidade da marcha e alterações no ângulo de torção e flexão do joelho (FAVRE; JOLLES, 2016). Atualmente, em estudos envolvendo humanos, a marcha pode ser analisada quanto à descrição cinemática e estimativa de parâmetros cinéticos por meio de sistemas laboratoriais envolvendo a captura dos movimentos (MÜNDERMANN; DYRBY; ANDRIACCHI, 2005). Dessa forma, o presente estudo tentou investigar se a OA induzida por MIA promoveu alterações na marcha dos animais avaliados, e se o tratamento com US ou LASER teve alguma influência nos parâmetros avaliados.

Avaliando a marcha dos camundongos, observou-se que os animais que receberam MIA i.a. apresentaram menor ângulo articular do joelho durante a fase de apoio médio. Foi visto também um aumento do ângulo articular no 21º dia após a indução da OA apenas no grupo tratado com US, em relação aos animais MIA. Boettger e colaboradores (2011) avaliaram a marcha de ratos com artrite induzida por antígenos por meio de um sistema videográfico com raio X, durante 21 dias. Os autores notaram que, nos primeiros 7 dias de avaliação, o joelho acometido apresentou amplitude de movimento (ADM) drasticamente menor que o joelho contralateral, o qual teve a amplitude de movimento aumentada de forma compensatória. Eles também verificaram que o efeito antinociceptivo do tratamento com morfina e dexametasona reverteu a alteração de ADM do joelho afetado para valores próximos do basal. Em camundongos, Makii e colaboradores (2018) demonstraram que os ângulos articulares do joelho e tornozelo foram reduzidos nos animais com OA induzida por ressecção de menisco, em relação aos animais controle. Outro achado foi que a administração oral de celecoxibe, um anti-inflamatório não esteroide inibidor seletivo da COX-2, melhorou a ADM desses animais. Os autores acreditam que o efeito antinociceptivo da droga pode ter influenciado a ADM do joelho afetado.

No nosso estudo, observou-se que o tratamento com US possibilitou maiores ângulos articulares durante a fase de apoio médio no 21º dia. Considerando que antinocicepção causada pelo US foi maior no 21º dia, quando foi feita a captura da marcha dos animais, possivelmente a influência desse recurso na marcha foi devido a esse efeito antinociceptivo. Os animais tratados com LASER apresentaram menor nocicepção ao longo do período de avaliação, porém, curiosamente, não apresentaram reversão da nocicepção no dia 21 e, por essa razão, o LASER pode não ter exercido influência na marcha dos animais. Dessa forma, é possível que o

efeito antinociceptivo tardio do US tenha sido responsável pelo resultado clínico aparente melhor na avaliação do ângulo articular do joelho durante a marcha, em relação ao LASER.

O nosso estudo também avaliou a área plantar do membro afetado pela OA, uma vez que a impressão da área da pata de roedores pode ser afetada por distúrbios musculoesqueléticos (JACOBS; KLOEFKORN; ALLEN, 2009). Observamos que não houve alteração da área de contato da pata com a superfície durante a fase de apoio médio do membro afetado pela OA, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar de uma tendência à menor área plantar do grupo MIA. Esses resultados discordam dos achados de Zahoor e colaboradores (2018), por exemplo, que observaram menor área plantar dos animais com OA induzida por fratura do platô tibial medial. Foram também relatadas maiores áreas plantares nos animais com OA tratados com US pulsado por 20 minutos, com intensidade de 30 mW/cm²., seja com tratamento precoce (nas duas semanas após a indução) ou tardio (na terceira e quarta semana após a indução). Algumas diferenças do estudo de Zahoor em relação ao nosso chamam a atenção, e podem explicar a discordância entre os resultados. Primeiro, o modelo de indução da OA é diferente. Segundo, os parâmetros do US utilizados podem levar a resultados clínicos distintos. E, por último, a marcha dos animais foi capturada utilizando o sistema de análise de marcha CatWalk, um sistema automatizado baseado em luz infravermelha para mensurar a área plantar, oferecendo maior exatidão nas análises. Entretanto, cabe ressaltar que o presente estudo utilizou um sistema de captura de vídeo de baixo custo, que pode não ter sido sensível o bastante para detectar alterações na marcha dos animais.

Similarmente, Yip e colaboradores (2016) reportaram que ratas com OA induzida pela lesão do LCA apresentaram menor área plantar do membro afetado durante a marcha, em discordância com os achados do presente estudo. No estudo de Yip, os animais foram tratados com LASER de 830 nm e potência máxima de 50 mW (a densidade de energia não foi especificada pelos autores). Os animais tratados demonstraram uma tendência de aumento da área plantar do membro afetado, e menor tempo de balanço, que representa maior tempo de apoio do membro afetado, porém, quando comparados com os animais não tratados, não diferença estatística. Os nossos resultados corroboram com os achados de Yip, uma vez que os grupos tratados apresentam área plantar ligeiramente maior que o grupo MIA, porém sem significância.

Embora os dados do presente trabalho tenham mostrado uma tendência a menores valores de ângulo articular do joelho no grupo MIA, não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos, com exceção do grupo MIA/US, que apresentou um aumento significativo em relação ao grupo MIA. Os dados referentes à área plantar durante a marcha também não revelaram diferença entre os grupos, mesmo com uma tendência à diminuição da área da pata nos animais do grupo MIA em relação aos demais grupos. De uma forma geral, apesar de ter sido identificada nocicepção no nosso modelo, ela pode não ter sido intensa o bastante para provocar alterações significativamente impactantes na marcha. Considerando que nosso modelo se trata de um modelo de OA precoce, em que a degeneração articular ainda não se encontra em estágio avançado, talvez por esse motivo os animais não tenham manifestado alterações na marcha de forma tão evidente. Sendo assim, os nossos achados mostraram que o modelo de OA inicial utilizado não alterou de forma significativa a marcha dos animais, e por tal motivo o tratamento com US e LASER não gerou resultados claros, apesar de uma aparente influência do US no ângulo articular do joelho.

Como já foi mencionado anteriormente, o modelo nociceptivo de OA induzida por MIA provocou nocicepção nos animais avaliados do 3º ao 21º dia na avaliação do limiar nociceptivo mecânico pelo teste de *von Frey*. Devido a inúmeros relatos na literatura reconhecendo a contribuição das células da glia na nocicepção induzida pela OA e em outros modelos de dor (ADÃES et al., 2017; IM et al., 2016; OGBONNA et al., 2013; SAGAR et al., 2011; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001), decidiu-se portanto avaliar se a nocicepção apresentada pelos animais tinha participação das células da glia espinais.

A micróglia tem ganhado evidência na investigação para elucidar os mecanismos associados com a dor crônica. As células microgliciais são células imunes residentes do SNC. Na medula espinal, as células da glia se tornam ativadas quando estímulos nociceptivos intensos chegam na medula espinal (TSUDA, 2017). A micróglia estabelece uma relação de *crosstalk* com os neurônios e astrócitos no CDME, em que estímulos vindos dos neurônios podem ativar a micróglia, que por sua vez libera mediadores que vão estimular e sensibilizar de volta os neurônios (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Na medula espinal, acredita-se que a micróglia seja ativada primeiro em relação aos astrócitos, normalmente participando da gênese da dor patológica e crônica, mas não da manutenção (RAGHAVENDRA; TANGA;

DELEO, 2003; SAGAR et al., 2011). Sendo assim, a micróglia desempenha um papel importante na dor, e por isso a sua participação foi pesquisada no presente estudo.

Os nossos achados demonstraram que a injeção de minociclina por via intratecal foi capaz de reverter temporariamente a nocicepção induzida pela OA, de acordo com a duração do seu efeito, indicando que a micróglia parece estar envolvida com a nocicepção induzida pela OA no nosso modelo. A minociclina é um antibiótico bacteriostático da família das tetraciclinas, porém recentemente uma vasta gama de efeitos biológicos advindos do seu uso tem sido identificada. Por ter uma alta solubilidade lipídica, a minociclina atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, e com isso pode exercer efeitos neuroprotetores em diversas patologias do SNC por meio da inibição microglial (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013). Os nossos achados corroboram com dados encontrados na literatura. Sagar e colaboradores (2011) também observaram redução no comportamento nociceptivo de ratos com OA induzida por MIA tratados com minociclina, porém os autores não deixaram clara a via de administração da droga. Além disso, Sagar verificou que a diminuição no comportamento nociceptivo dos animais esteve relacionada com a redução da expressão do marcador microglial Iba1 no CDME, que estava aumentada previamente ao tratamento. Raghavendra (2003), em um modelo de dor neuropática causada pela transecção dos nervos espinais de L4 e L5, demonstrou que a pré-administração associada à injeção diária de minociclina atenuou a alodínia mecânica durante os 10 dias de avaliação e reduziu a expressão do RNA mensageiro responsável pela síntese de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal dos animais. Todavia, a minociclina nesse estudo foi administrada por via intraperitoneal (RAGHAVENDRA, 2003). Cabe salientar que os estudos mencionados utilizaram doses bem mais elevadas do que as utilizadas no presente estudo. No nosso estudo, a minociclina foi injetada em baixas doses de 30 e 60 ng diretamente no espaço subaracnóideo e, pela proximidade das células alvo que a injeção intratecal proporciona, uma dose relativamente baixa pode exercer seus efeitos sem que efeitos colaterais aconteçam. Nos estudos supracitados, doses mais elevadas de 5,7 mg e 7,5 mg foram utilizadas, porém, a administração foi intraperitoneal. Portanto, o efeito é sistêmico, tornando necessária uma maior dose para que as células alvo sejam efetivamente atingidas. Sendo assim, os achados do presente estudo indicam que as células microgliais participam na nocicepção induzida pela OA, uma vez que sua inibição resultou em antinocicepção.

Os astrócitos compõem o tipo de célula da glia mais abundante do SNC. Embora no passado os astrócitos tenham sido considerados apenas células de suporte para a função dos neurônios, sabe-se hoje em dia que as funções dos astrócitos vão muito além disso. Entre as funções dos astrócitos estão a manutenção da homeostase hídrica e de íons, manutenção da barreira hematoencefálica e das sinapses (JÄKEL; DIMOU, 2017). Porém, devido à sua proximidade às sinapses entre neurônios, os astrócitos podem participar de forma ativa nessas sinapses, uma vez que expressa também receptores para neurotransmissores liberados pelos neurônios (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). Por esse motivo, os astrócitos também participam desse *crosstalk* entre neurônios e células da glia, podendo amplificar as respostas nociceptivas dos neurônios. Evidências na literatura relatam que os astrócitos tornam-se ativos com estímulos nociceptivos vindos da periferia, mas eles são implicados com maior frequência na potencialização e manutenção da dor crônica (GAO et al., 2010; SAGAR et al., 2011). Considerando que os astrócitos podem contribuir para a dor, foi investigado também no nosso estudo a sua participação na nocicepção induzida pela OA.

Similarmente, no presente estudo a administração de fluorocitrato por via i.t. também promoveu antinocicepção da terceira à quinta hora após a sua aplicação, sugerindo a participação dos astrócitos na OA induzida por MIA. O fluorocitrato é uma droga que interrompe o ciclo de Krebs pela inibição da enzima aconitase, perturbando assim o metabolismo celular. No SNC, essa droga tem bastante afinidade pelas células gliais e, por esse motivo, tem sido utilizada para estudar a função dessas células por meio da sua inibição (SWANSON; GRAHAM, 1994). Os nossos achados estão de acordo com os resultados reportados por Adães e colaboradores (2017), que administraram uma dose de 0,1 nM de fluorocitrato por via i.t. e observaram uma redução da nocicepção induzida por movimento da primeira à quarta hora após a aplicação, em um modelo de OA induzida pela injeção i.a. de colagenase em ratos. Os autores ainda relataram que a OA induzida pela colagenase aumentou a expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP), um marcador específico de ativação de astrócitos, nos GRDs, mas não no CDME. A OA também aumentou a expressão de Iba1 no CDME, indicando aumento na ativação de de micróglia na medula espinal. Curiosamente, os autores não investigaram diretamente se a injeção i.t. de fluorocitrato influenciou a ativação de astrócitos e micróglia pela expressão de GFAP e Iba1, respectivamente, mas eles discutem que o efeito antinociceptivo do

fluorocitrato ocorreu provavelmente devido à inibição das células gliais. Meller e colaboradores (1994) mostraram que a injeção i.t. de fluorocitrato atenua de forma dose-dependente a hiperalgesia térmica e mecânica em ratos submetidos a um modelo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de Zymosan. Os nossos achados corroboram com os resultados apresentados por Meller, uma vez que a nossa maior dose resultou em uma reversão completa da nocicepção, enquanto a menor dose resultou em uma reversão parcial. Dessa forma, sugere-se que os astrócitos espinais tenham contribuído para a nocicepção induzida pela OA em nosso modelo.

A participação das células da glia na nocicepção induzida pela OA é relevante por uma série de motivos. As células da glia espinais, quando ativadas, produzem um microambiente no SNC que induz a sensibilização de neurônios de segunda ordem nociceptivos devido à liberação de fatores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos, fatores de crescimento, prostaglandinas, entre outros mediadores (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Por tal motivo, as células da glia podem ser importantes alvos terapêuticos no controle da dor não somente na OA, mas em vários outros quadros de dor patológica. Embora estratégias farmacológicas para atuar nas células da glia sejam bastante estudadas, poucos são os estudos voltados para terapias não farmacológicas. Os recursos fisioterapêuticos, incluindo o US e o LASER, também apresentam potencial para modular a atividade das células da glia, segundo estudos. Por exemplo, Hung e colaboradores (2016) viram que o tratamento com US reduziu a ativação de células microgliais no CDME em um modelo de dor neuropática. A redução da ativação microglial pelo tratamento com o US nesse estudo foi acompanhada por um aumento de IL-10 e redução de IL-6, o que pode ter contribuído para o efeito antinociceptivo relatado pelos autores. Outro exemplo foi o estudo de Kobiela Ketz e colaboradores (2017), que investigou o efeito da FBM com um LASER de 980 nm na expressão de micróglia ativada no CDME e núcleo grácil do bulbo em um modelo de dor neuropática. Apesar de não ter sido notada uma redução da expressão de Iba1 na medula espinal com o tratamento por LASER em relação aos animais não tratados, no núcleo grácil essa redução foi observada. Apesar dos resultados divergentes, a micróglia aparenta sofrer influência do tratamento com US e LASER, porém mais estudos são necessários.

Estudos envolvendo o efeito do US e do LASER na ativação de astrócitos seriam inexistentes, se não fosse pelo estudo de Deguchi, Kim e Kamioka (2017). Eles

estudaram o efeito da FBM com LASER pulsado de CO² (os parâmetros não foram detalhados pelos autores) em um modelo experimental de dor tardia associada ao movimento do dente em ratos. Foi verificado que a nocicepção aumentou a expressão dos marcadores de atividade de astrócitos e micróglia, respectivamente GFAP e CD-11b, nos núcleos do tronco encefálico, indicando maior ativação dessas células. No entanto, o tratamento com LASER provocou uma tendência à redução da ativação das células da glia em relação aos animais não tratados, porém a diferença não foi estatisticamente significativa, apesar de ter promovido efeitos antinociceptivos e reduzido a expressão de c-Fos, um marcador de atividade de neurônios nociceptivos. Devido à insuficiência de estudos a esse respeito, precisa-se de mais estudos para afirmar a capacidade dos recursos fisioterapêuticos de afetar a atividade dos astrócitos.

A literatura ainda não apresenta dados concretos sobre o efeito do US e do LASER na atividade das células da glia especificamente na OA. Portanto, estudos são necessários para sanar essa carência, uma vez que o potencial de modular a atividade das células da glia por parte dos recursos fisioterapêuticos existe e já está sendo explorado.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os achados do presente estudo, conclui-se que o tratamento diário com US e LASER foi eficaz em reduzir a nocicepção induzida pela OA. Além disso, o modelo de OA utilizado no nosso estudo assemelha-se a um estágio inicial da patologia, e dessa forma não ocasionou alterações da marcha dos animais, nem da temperatura e do diâmetro da articulação afetada. Acreditamos que, por esse motivo, os recursos fisioterapêuticos não tenham influenciado tais parâmetros avaliados. Por fim, sugerimos também que a micróglia e os astrócitos espinais estejam envolvidos na nocicepção induzida pelo modelo de OA utilizado neste estudo.

REFERÊNCIAS

ADÃES, S. et al. Glial activation in the collagenase model of nociception associated with osteoarthritis. **Molecular Pain**, v. 13, p. 1–12, 2017.

AL-SAFFAR, F. J. et al. Collagenase and sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis model in sprague dawley rats. **Asian Journal of Scientific Research**, v. 2, n. 4, p. 167–179, 2009.

ALFREDO, P. P. et al. Efficacy of low level laser therapy associated with exercises in knee osteoarthritis: A randomized double-blind study. **Clinical Rehabilitation**, v. 26, n. 6, p. 523–533, 2012.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40–56, 2004.

ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 4, p. 183–184, 2015.

ANDERSON, D. W.; BARRETT, J. T. Depression of phagocytosis by ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 7, n. 3, p. 267–273, 1981.

ANDRADE, A. L. M.; BOSSINI, P. S.; PARIZOTTO, N. A. Use of low level laser therapy to control neuropathic pain: A systematic review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 36–42, 2016.

ANGELOVA, A.; ILIEVA, E. M. Effectiveness of high intensity laser therapy for reduction of pain in knee osteoarthritis. **Pain Research and Management**, v. 2016, p. 1-11, 2016.

ASSIS, L. et al. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 1, p. 169–177, 2016.

BAKER, K. G. A Review of Therapeutic Ultrasound: Biophysical Effects. **Physical Therapy**, v. 81, p. 1351-1358, 2001.

BARNES, E. V.; EDWARDS, N. L. Treatment of osteoarthritis. **Southern Medical Journal**, v. 98, n. 2, p. 205-209, 2005.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S. **Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. p. 171–186.

BERTOLINI, G. R. F. et al. Comparison of continuous and pulsed ultrasound therapy in knee hyperalgesia of Wistar rats. **Revista Dor**, v. 15, n. 4, p. 287–289, 2014.

BOETTGER, M. K. et al. Videoradiographic analysis of the range of motion in unilateral experimental knee joint arthritis in rats. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13, n. 3, p. 1-11, 2011.

BRANDT, K. D.; DIEPPE, P.; RADIN, E. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. **Medical Clinics of North America**, v. 93, n. 1, p. 1–24, 2009.

BRENNER, M. Thermal signature analysis as a novel method for evaluating inflammatory arthritis activity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 3, p. 306–311, 2006.

CASAROTTO, R. A. et al. Coupling agents in therapeutic ultrasound: acoustic and thermal behavior ,. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 85, n. 1, p. 162–165, 2004.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55–63, 1994.

CHEN, Y. W. et al. Therapeutic Ultrasound Suppresses Neuropathic Pain and Upregulation of Substance P and Neurokinin-1 Receptor in Rats after Peripheral Nerve Injury. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 41, n. 1, p. 143–150, 2015.

CHOW, R. 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.

CHOW, R. T.; DAVID, M. A.; ARMATI, P. J. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 12, n. 1, p. 28–39, 2007.

CHUNG, J.; MIN, B.; BAIK, E. J. Effect of Continuous-Wave Low- Intensity Ultrasound in Inflammatory Resolution of Arthritis-Associated Synovitis. **Physical Therapy**, v. 96, n. 6, p. 808–817, 2016.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- α levels after sciatic nerve crush in mice. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 8, p. 1193–1204, 2013.

COIMBRA, I. B. et al. Consenso Brasileiro para o tratamento da osteoartrite (artrose). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p. 371-374, 2002.

CORADINI, J. G. et al. Comparison of low level laser, ultrasonic therapy and association in joint pain in Wistar rats. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 54, n. 1, p. 7–12, 2014.

COTLER, H. B. et al. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. **MOJ Orthopedics & Rheumatology**, v. 2, n. 5, p. 1–8, 2015.

DALECKI, D. Mechanical Bioeffects of Ultrasound. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 229–248, 2004.

DEGUCHI, T.; KIM, D. G.; KAMIOKA, H. CO₂ low-level laser therapy has an early but not delayed pain effect during experimental tooth movement. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 20, p. 172–176, 2017.

DENOBLE, A. E. et al. Patellar skin surface temperature by thermography reflects knee osteoarthritis severity. **Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v. 3, p. 69–75, 2010.

DOAN, N. et al. In Vitro Effects of Therapeutic Ultrasound on Cell Proliferation , Protein Synthesis , and Cytokine Production by Human and Fibroblasts, Osteoblasts, and Monocytes. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 57, p. 409–419, 1999.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3760–3772, 2010.

DYSON, M.; LUKE, D. A. Induction of mast cell degranulation in skin by ultrasound.

IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, v. 33, n. 2, p. 194–201, 1986.

EBADI, S. et al. Therapeutic ultrasound for chronic low-back pain. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2014.

EYRE, D. R. Collagens and cartilage matrix homeostasis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 427, p. 118–122, 2004.

F. SALAFFI, A. CIAPETTI, M. C. The sources of pain in osteoarthritis: a pathophysiological review. **Reumatismo**, v. 66, n. 1, p. 57–71, 2014.

FAVERO, M. et al. Early knee osteoarthritis. **RMD Open**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2015.

FAVRE, J.; JOLLES, B. M. Gait analysis of patients with knee osteoarthritis highlights a pathological mechanical pathway and provides a basis for therapeutic interventions. **EFORT Open Reviews**, v. 1, n. 10, p. 368–374, 2016.

FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, 2016.

FUKUDA, V. O. et al. Short-Term Efficacy of Low-Level Laser Therapy in Patients With Knee Osteoarthritis: a Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 46, n. 5, p. 526–533, 2011.

GAO, Y. J. et al. The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 309–319, 2010.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Minocycline: Far beyond an antibiotic. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 337–352, 2013.

GIORDANO, J. et al. Mechanisms and effects of transcranial direct current stimulation. **Dose-Response**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2017.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, 2014.

GUO, H. et al. Comparing different physical factors on serum TNF- α levels, chondrocyte apoptosis, caspase-3 and caspase-8 expression in osteoarthritis of the knee in rabbits. **Joint Bone Spine**, v. 78, n. 6, p. 604–610, 2011.

GUZMAN, R. E. et al. Mono-Iodoacetate-Induced Histologic Changes in Subchondral Bone and Articular Cartilage of Rat Femorotibial Joints: an Animal Model of Osteoarthritis. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 6, p. 619–624, 2003a.

GUZMAN, R. E. D. V. M. 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**, v. 11, p. 821–830, 2003b.

HEGEDUS, B. et al. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, n. 4, p. 577–84, 2009.

HEIDARI, B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 205–212, 2011.

HILLEN, A. E. J.; BURBACH, J. P. H.; HOL, E. M. Cell adhesion and matricellular support by astrocytes of the tripartite synapse. **Progress in Neurobiology**, v. 165-167, p. 66-86, 2018.

HSIEH, Y. L. Reduction in induced pain by ultrasound may be caused by altered expression of spinal neuronal nitric oxide synthase-producing neurons. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 86, n. 7, p. 1311–1317, 2005.

HSIEH, Y. L. Peripheral Therapeutic Ultrasound Stimulation Alters the Distribution of Spinal C-Fos Immunoreactivity Induced by Early Or Late Phase of Inflammation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 34, n. 3, p. 475–486, 2008.

HU, X. M. et al. CXCL12/CXCR4 chemokine signaling in spinal glia induces pain hypersensitivity through MAPKs-mediated neuroinflammation in bone cancer rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 132, n. 4, p. 452–463, 2015.

HUNG, C. et al. Therapeutic Ultrasound and Treadmill Training Suppress Peripheral Nerve Injury–Induced Pain in Rats. **Physical Therapy**, v. 96, n. 10, p. 1545–1553, 2016.

HUNTER, D. J. et al. The symptoms of OA and the genesis of pain. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 3, p. 1–19, 2009.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**, v. 67, p. 313–316, 1980.

ILTER, L. et al. Efficacy of pulsed and continuous therapeutic ultrasound in myofascial pain syndrome: A randomized controlled study. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 94, n. 7, p. 547–554, 2015.

IM, H.-J. et al. Inhibition of glial NF-KB abolishes pain in knee osteoarthritis model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 2016, p. S35, 2016.

IZADIFAR, Z.; BABYN, P.; CHAPMAN, D. Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 43, n. 6, p. 1085–1104, 2017.

JACOBS, B. Y.; KLOEFKORN, H. E.; ALLEN, K. D. Gait Analysis Methods for Rodent Models of Osteoarthritis. **Current Pain and Headache Reports**, v. 18, p. 1–11, 2014.

JAIRAM, A.; MANISHA, J. Infrared Thermography on Osteoarthritis-A Review. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 6, n. 5, p. 50–53, 2016.

JÄKEL, S.; DIMOU, L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 1–17, 2017.

JIMBO, S. et al. A Novel Rat Model of Ankle Osteoarthritis Induced by the Application of Monoiodoacetate. **Journal of Arthritis**, v. 6, n. 6, p. 1-5, 2017.

JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. **Journal of Athletic Training**, v. 37, n. 3, p. 293–299, 2002.

JOHNSON, V. L.; HUNTER, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 28, n. 1, p. 5–15, 2014.

KANDEL, E. R. ET AL. **Princípios de Neurociências**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.

KANJU, P. et al. Small molecule dual-inhibitors of TRPV4 and TRPA1 for attenuation of inflammation and pain. **Scientific reports**, v. 6, p. 26894, 2016.

KARU, T. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 20, n. 2, p. 143-148, 2014.

KARU, T. I. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation Tiina. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 1091–1099, 2008.

KEAN, W. F.; KEAN, R.; BUCHANAN, W. W. Osteoarthritis: Symptoms, signs and source of pain. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 3–31, 2004.

KIDD, B. Mechanisms of Pain in Osteoarthritis. **HSS Journal**, v. 8, n. 1, p. 26–28, 2012.

KIELIAN, T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 5, p. 711-730, 2006.

KIM, G.; KIM, E. Anti-Inflammation Effects of Low Intensity Laser Therapy on Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 25, p. 173–175, 2013.

KIMELBERG, H. K.; NEDERGAARD, M. Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 338–353, 2010.

KOBIELA KETZ, A. et al. Characterization of Macrophage/Microglial Activation and Effect of Photobiomodulation in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. **Pain medicine (Malden, Mass.)**, v. 18, n. 5, p. 932–946, 2017.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009.

LEE, Y. et al. Monosodium Iodoacetate-Induced Joint Pain is Associated with Increased Phosphorylation of Mitogen Activated Protein Kinases in the Rat Spinal Cord. **Molecular Pain**, v. 7, n. 39, p. 1-10, 2011.

LEGAY, M. et al. Enhancement of heat transfer by ultrasound: Review and recent advances. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, p. 1-17, 2011.

LEONG, D. J. et al. Therapeutic Ultrasound : Osteoarthritis Symptom- Modification and Potential for Disease Modification. **Journal of Surgery**, v. 1, n. 2, p. 1–5, 2013.

LIU, C.-C.; HUNG, C.-H. Therapeutic ultrasound attenuates allodynia induced by thoracotomy and rib retraction in rats. **Physiotherapy**, v. 101, n. e893, 2015.

LOVE, L. A.; KREMKAU, F. W. Intracellular temperature distribution produced by ultrasound. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 67, n. 3, p. 1045–1050, 1980.

LOYOLA-SÁNCHEZ, A.; RICHARDSON, J.; MACINTYRE, N. J. Efficacy of ultrasound therapy for the management of knee osteoarthritis: A systematic review with meta-analysis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 9, p. 1117–1126, 2010.

MAKII, Y. et al. Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically induced knee osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 26, n. 2, p. 1–7, 2018.

MARCU, K. B. et al. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. **Current drug targets**, v. 11, n. 5, p. 599–613, 2010.

MATSUO, H. et al. Early transcutaneous electrical nerve stimulation reduces hyperalgesia and decreases activation of spinal glial cells in mice with neuropathic pain. **Pain**, v. 155, n. 9, p. 1888–1901, 2014.

MAXWELL, L. et al. The Augmentation of Leucocyte Adhesion to Endothelium By Therapeutic Ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 20, n. 4, p. 383–390, 1994.

MELLER, S. T. et al. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1471–1478, 1994.

MEMIS, S.; CANDIRLI, C.; KERIMOGLU, G. Short term histopathological effects of GaAIs laser on experimentally induced TMJ osteoarthritis in rabbits. **Brazilian Oral Research**, v. 32, p. 1–10, 2018.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. In: **Classification of Chronic Pain**, 2. ed. Seattle: IASP Press, 2012.

MICHELI, L. et al. Photobiomodulation therapy by NIR laser in persistent pain: an analytical study in the rat. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1835–1846, 2017.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1–164, 1999.

MILLER, D. L. et al. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 31, n. 4, p. 623–634, 2012.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

MOJARAD, N. et al. The role of low level laser therapy on neuropathic pain relief and interleukin-6 expression following spinal cord injury: An experimental study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 87, p. 60–70, 2018.

MÜNDERMANN, A.; DYRBY, C. O.; ANDRIACCHI, T. P. Secondary gait changes in patients with medial compartment knee osteoarthritis: Increased load at the ankle, knee, and hip during walking. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 9, p. 2835–2844, 2005.

NAITO, K. et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) increases the articular cartilage type II collagen in a rat osteoarthritis model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 3, p. 361–369, 2010.

NEOGI, T.; ZHANG, Y. Epidemiology of osteoarthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 39, p. 1–19, 2013.

NIETO, F. R. et al. Calcitonin gene-related peptide-expressing sensory neurons and spinal microglial reactivity contribute to pain states in collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 67, n. 6, p. 1668–1677, 2015.

NUKI, G. Osteoarthritis: A problem of joint failure. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 58, n. 3, p. 142–147, 1999.

NWOSU, L. N. et al. Relationship between structural pathology and pain behaviour in a model of osteoarthritis (OA). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 11, p. 1910–1917, 2016.

O'NEILL; KALTSCHMIDT. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252–258, 1997.

OGBONNA, A. C. et al. Pain-like behaviour and spinal changes in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis in C57Bl/6 mice. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 4, p. 514–526, 2013.

OGBONNA, A. C.; CLARK, A. K.; MALCANGIO, M. Development of monosodium acetate-induced osteoarthritis and inflammatory pain in ageing mice. **Age**, v. 37, n. 3, p. 1-12, 2015.

ÖZGÖNENEL, L.; AYTEKIN, E.; DURMUŞOĞLU, G. A Double-Blind Trial of Clinical Effects of Therapeutic Ultrasound in Knee Osteoarthritis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 35, n. 1, p. 44–49, 2009.

PALLOTTA, R. C. et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 71–78, 2012.

PAN, H. et al. Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 31, n. 6, p. 849–856, 1 2005.

PEREIRA, D. et al. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: A systematic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 11, p. 1270–1285, 2011.

PIAO, Z. G. et al. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. **Pain**, v. 121, n. 3, p. 219–231, 2006.

PITCHER, T.; SOUSA-VALENTE, J.; MALCANGIO, M. The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse. **Journal of Visualized Experiments**, n. 111, p. 6–10, 2016.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99–104, 1999.

POYTON, R. O.; BALL, K. A. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. **Discovery medicine**, v. 11, n. 57, p. 154–159, 2011.

PURVES, D. Pain. In: PURVES, D. et al. **Neuroscience**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, p. 209–227, 2004.

RAGHAVENDRA, V. Inhibition of Microglial Activation Attenuates the Development but Not Existing Hypersensitivity in a Rat Model of Neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 624–630, 2003.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.; DELEO, J. A. Inhibition of Microglial Activation Attenuates the Development but Not Existing Hypersensitivity in a Rat Model of Neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 624–630, 2003.

REHER, P. et al. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, v. 11, n. 6, p. 416–423, 1999.

ROSENBAUM, T.; SIMON, S. A. **TRPV1 Receptors and Signal Transduction**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2007.

ROSIS, R. G. DE; MASSABKI, P. S.; KAIRALLA, M. Osteoartrite : avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 2, p. 101–108, 2010.

PELLETIER, J. P. et al. Osteoarthritis. **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 2, n. 16072, p. 1–18, 2016.

RUTJES, A. W. S. et al. Therapeutic ultrasound for osteoarthritis of the knee or hip. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2010.

SAGAR, D. R. et al. The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 88-99, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Osteoartrite (Artrose)**.

Disponível em: <<https://www.reumatologia.org.br/doencas/principais-doencas/osteoartrite-artrose/>>. Acesso em: 18 out. 2018.

STAHL, S. M. **Stahl's essential psychopharmacology**: neuroscientific basis and practical application. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

STIGLIC-ROGOZNICA, N. et al. Analgesic effect of high intensity laser therapy in knee osteoarthritis. **Collegium antropologicum**, v. 35, p. 183–185, 2011.

STRAUB, S. J.; JOHNS, L. D.; HOWARD, S. M. Variability in Effective Radiating Area at 1 MHz Affects Ultrasound Treatment Intensity. **Physical Therapy**, v. 88, n. 1, p. 50–57, 2008.

SWANSON, R. A.; GRAHAM, S. H. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. **Brain research**, v. 664, n. 1–2, p. 94–100, 1994.

TAKAHASHI, I. et al. Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–15, 2018.

WITTENAUER, R.; SMITH, L.; ADEN, K. Background Paper 6.12: Osteoarthritis. In: **Priority Medicines For Europe and the World**, World Health Organization, p. 31, 2013.

TAVARES, I.; MARTINS, I. Gene Therapy for Chronic Pain Management. In: **Gene Therapy - Tools and Potential Applications**. InTech, 2013.

TER HAAR, G. Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, n. 1–3, p. 111–129, 2007.

TSUDA, M. Modulation of Pain and Itch by Spinal Glia. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 178–185, 2018.

TSUI, P. H.; WANG, S. H.; HUANG, C. C. In vitro effects of ultrasound with different energies on the conduction properties of neural tissue. **Ultrasonics**, v. 43, n. 7, p. 560–565, 2005.

UDO, M. et al. Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: Proposed model-specific scoring systems. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 7, p. 1284–1291, 2016.

VAN DER KRAAN, P. M. et al. Development of osteoarthritic lesions in mice by “metabolic” and “mechanical” alterations in the knee joints. **The American journal of pathology**, v. 135, n. 6, p. 1001–1014, 1989.

VARJÚ, G. et al. Assessment of hand osteoarthritis: Correlation between thermographic and radiographic methods. **Rheumatology**, v. 43, n. 7, p. 915–919, 2004.

VERGE, G. M. et al. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1150–1160, 2004.

VERMA, P.; DALAL, K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p. 3507–3514, 2011.

WANG, P. et al. Effects of low-level laser therapy on joint pain, synovitis, anabolic, and catabolic factors in a progressive osteoarthritis rabbit model. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 6, p. 1875–1885, 2014.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: A driving force for pathological pain. **Trends in Neurosciences**, v. 24, n. 8, p. 450–455, 2001.

WOOLF, C. J. Central Sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3, p. 1–31, 2012.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7723–7730, 1999.

YANG, W.-Z. et al. Effects of Low Power Laser Irradiation on Intracellular Calcium and Histamine Release in RBL-2H3 Mast Cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 4, p. 979–984, jul. 2007.

YEĞİN, T.; ALTAN, L.; KASAPOĞLU AKSOY, M. The Effect of Therapeutic Ultrasound on Pain and Physical Function in Patients with Knee Osteoarthritis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 43, n. 1, p. 187–194, 2017.

YIP, K.-K. et al. Effects of low level laser therapy: a study of status of cartilage, subchondral bone and gait adaptation in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 2016, p. S487–S488, 2016.

ZAHOOR, T. et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on joint injury and post-traumatic osteoarthritis : an animal study. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 44, n. 1, p. 234–242, 2018.

ZENG, C. et al. Effectiveness of continuous and pulsed ultrasound for the management of knee osteoarthritis: A systematic review and network meta-analysis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 8, p. 1090–1099, 2014.

ZENG, C. et al. Electrical stimulation for pain relief in knee osteoarthritis: Systematic review and network meta-analysis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 2, p. 189–202, 2015.

ZHANG, C. et al. Effects of therapeutic ultrasound on pain, physical functions and safety outcomes in patients with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Rehabilitation**, v. 30, n. 10, p. 960–971, 2016.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 701. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da influência dos recursos fisioterapêuticos na atividade das células da glia na dor induzida pela osteoartrite em camundongos", registrada com o nº 49/2017, sob a responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 09/10/2017 a 15/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	48
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 09 de Outubro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL