

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Jeanne Brenda Martins

Treinamento físico moderado em esteira modula biomarcadores articulares e melhora o desempenho funcional em ratos com osteoartrite de joelho induzida

DIAMANTINA – MG

2017

Jeanne Brenda Martins

**TREINAMENTO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA MODULA
BIOMARCADORES ARTICULARES E MELHORA O DESEMPENHO FUNCIONAL
EM RATOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO INDUZIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na área de concentração em Ciências Fisiológicas, como requisito para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Amaral Mendonça

Diamantina, 2017

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

M386t Martins, Jeanne Brenda.

Treinamento físico moderado em esteira modula biomarcadores articulares e melhora o desempenho funcional em ratos com osteoartrite de joelho induzida / Jeanne Brenda Martins. – Diamantina, 2017.

79 p.

Orientadora: Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Coorientadora: Vanessa Amaral Mendonça

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Degradação articular. 2. Estresse Oxidativo. 3. Inflamação. 4. Exercício Físico. I. Lacerda, Ana Cristina Rodrigues. II. Mendonça, Vanessa Amaral. III. Título.

CDD 612.044

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

JEANNE BRENDA MARTINS

**TREINAMENTO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA MODULA
BIOMARCADORES ARTICULARES E MELHORA O DESEMPENHO
FUNCIONAL EM RATOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO INDUZIDA**

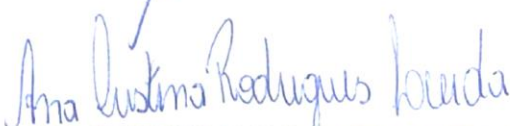
Dissertação apresentada ao
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - STRICTO SENSU,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Orientador : Prof.^a Dr.^a Ana Cristina
Rodrigues Lacerda

Data da aprovação : 23/06/2017


Prof.^a Dr.^a LEANI SOUZA MÁXIMO PEREIRA - UFMG


Prof.Dr. MARCO FABRICIO DIAS PEIXOTO - UFVJM


Prof.^a Dr.^a ANA CRISTINA RODRIGUES LACERDA - UFVJM

DIAMANTINA

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, em especial a minha mãe, que enfrenta diariamente limitações funcionais causadas pela osteoartrite.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor maior da vida, por ser meu refúgio, alento e luz nos momentos de dúvidas, angústias e por me abençoar em todas as etapas da realização desse trabalho.

As minhas queridas professoras Ana Cristina Rodrigues Lacerda e Vanessa Amaral Mendonça, pela confiança e autonomia em mim depositadas, pela presença constante em todo o desenvolvimento do estudo, pela orientação, por serem grandes exemplos de competência, além dos ensinamentos, palavras amigas, tranquilizadoras e pela constante fonte de inspiração!

Aos professores Hércules, Pedro, Ana Camargos, Murilo e Etel por estarem sempre dispostos a me ajudar no que precisei, pelas contribuições para realização desse trabalho.

Aos meus pais, pela presença constante e incentivo, por serem motivo e razão do meu esforço e dedicação, não é possível descrever a gratidão que tenho por me proporcionarem a oportunidade da instrução e não medir esforços para isso, sacrificando muitas vezes seus objetivos para que eu realizasse meus sonhos. Esta, e todas as outras conquistas serão sempre para os dois. Amo vocês!

Aos meus irmãos Jennifer, Jefferson e André pelo apoio incondicional.

Aos amigos da pós-graduação, por tornarem a caminhada mais leve e alegre, em especial a Sueli, Dirceu e Talita que tornaram todo o período de coleta mais divertido e enriqueciam o estudo a cada experiência compartilhada.

As amigas e companheiras da república Layane, Tamara, Nayara e agora a Duda! Pelo apoio, pela preocupação, por sempre estarem dispostas a me ajudar para o que precisei. Por serem minha família quando chegava em casa cansada!

A amiga-irmã Jennifer, pela paciência e compreensão em todos os momentos de ausência! Obrigada por ser tão presente, mesmo distante!

Aos amigos que a vida me trouxe, Ludmilla, Bianca, Isabelinha, Lorrane, Rebeca, Ariane e Gabriel, todos vocês contribuíram com conselhos, escutaram minhas dúvidas e acima de tudo, por me alegrarem todos os dias com tanta amizade e carinho. Em especial, a Isabela Paranhos, que me apresentou a UFVJM e que divide comigo há tantos anos todas as alegrias e tristezas. Sorte na vida é ter vocês!

Aos meus presentes de diamantina Jhullian, Vanessa, Simone e Daniel Reis que foram meus alicerces, sustento e fontes de amor no momento em que eu mais precisei.

Aos meus anjos da guarda, Rafael e Marcos, que me encantam com a pureza e amizade incondicional, por melhorarem constantemente minha versão pessoal com os ensinamentos de humildade e amor.

A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e a Sociedade Brasileira de Fisiologia.

Aqueles que por ventura eu possa não ter mencionado, mas que foram também imprescindíveis na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Se apenas houvesse uma única verdade, não poderiam pintar-se cem telas sobre o mesmo tema.

Pablo Picasso

RESUMO

A osteoartrite é uma doença articular degenerativa que causa dor, diminuição da amplitude de movimento, perda de função e incapacidade física para executar as principais atividades de vida diária. O exercício constituído por caminhada de intensidade moderada em esteira é um dos tratamentos não farmacológicos da osteoartrite de joelho, mas seus efeitos especificamente em biomarcadores relacionados com degradação articular de joelho e possível associação com funcionalidade permanecem inconclusivos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento com exercício físico de intensidade moderada em esteira nos biomarcadores sistêmicos de estresse oxidativo, parâmetros inflamatórios locais, no desempenho físico funcional, além de quantificar células da cartilagem em ratos com osteoartrite de joelho induzida. **Materiais e método:** 27 ratos Wistar (433 + 18g, 12 semanas de idade) foram divididos em três grupos (n = 9 por grupo): grupo sham (SHAM); grupo osteoartrite de joelho induzida (OA); grupo treinamento com exercício físico e osteoartrite de joelho (OAT). A osteoartrite de joelho foi induzida por uma única injeção de monoiodoacetato de sódio (MIA) na concentração de 1,2 mg. O treinamento físico foi progressivo (16 m/min⁻¹ 30-50 min/dia) e com frequência de 3 dias/semana durante 8 semanas. Vinte e quatro horas após o último dia de intervenção, todos os animais dos três grupos realizaram testes funcionais incluindo número de quedas durante o teste Rotarod, tempo e número de falhas durante o deslocamento em plataforma de 100 cm. Em seguida, os ratos foram eutanasiados e materiais biológicos coletados para a avaliação de biomarcadores articulares inflamatórios e sistêmicos para avaliação do estado redox. A articulação do joelho foi removida e utilizada para avaliação histológica. Foram utilizados para analisar os dados o teste ANOVA oneway ($p \leq 0,05$) seguido de post-hoc Tukey (dados paramétricos) ou Kruskal Wallis seguido de post-hoc de Dunn (não paramétricos). Modelos de regressão linear múltipla *stepwise* foram aplicados a fim de verificar a associação entre biomarcadores e funcionalidade. **Resultados:** O grupo OAT apresentou maiores escores de desempenho funcional em todos os testes de função articular (teste de Rota rod $p = 0,002$, tempo de falhas de deslocamento $p = 0,005$, número de falhas de deslocamento $p = 0,0002$) comparado com os demais grupos. Observou-se redução nas concentrações articulares dos biomarcadores de degradação articular (IL-1 β $p < 0,0001$, TNF- α $p = 0,0001$) e aumento na concentração articular de BDNF no grupo OAT comparado ao grupo OA. Além disso, as concentrações articulares das citocinas IL-6 ($p < 0,005$) e IL-10 ($p < 0,0001$) foram maiores no grupo OA comparado aos demais grupos. As concentrações de ambos marcadores articulares (IL-1 β e TNF- α) explicaram 58% da

variabilidade do número de quedas ($p < 0,001$), ao passo que o TNF- α analisado isoladamente explicou 29% da variabilidade do tempo de deslocamento em percurso conhecido ($p = 0,002$) e 21% da variabilidade do número de quedas ($p = 0,01$). Conclusão: Todos os achados indicam a eficácia do treinamento de intensidade moderada em esteira para reduzir a degradação articular de joelho com OA induzida, uma vez que modula biomarcadores locais inflamatórios e sistêmicos relacionados com estresse oxidativo. Além disso, esta modulação em biomarcadores de degradação articular propiciou conservação celular que impactou positivamente na funcionalidade de ratos com osteoartrite de joelho induzida por monoiodoacetado de sódio.

Palavras chave: Degradação articular, Estresse Oxidativo, Inflamação, Exercício Físico.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the effect of moderate treadmill training on joint inflammatory profile and functional performance on induced knee OA in rats.

METHODS: 27 male rats were divided into three groups of nine animals each: sham (SHAM); induced knee OA (OA); OA exercise training (OAT). The knee OA was induced by monosodium iodoacetate. The OAT group trained for 8 weeks. Functional tests including Rota rod test, displacement in footbridge of 100 cm were performed. The right joint lavage was used for IL1 β , TNF, IL10 analysis. Articular capsule of the same joint was used for BDNF and IL6 analysis. The left joint was used for histological analysis. Redox status was evaluated in plasma.

RESULTS: Oxidative stress parameters and joint biomarkers inflammatory profile indicate the induction of knee OA. The OAT group presented a higher functional performance in all joint function tests, reduction of IL1 and TNF joint level, increase of BDNF joint level. The levels of both IL1 and TNF explained 58% of the variability of number of falls, while only TNF explained 29% of the variability of time of displacement and 21% of the variability of number of displacement failures. The histological data confirm the preservation rate of chondrocytes in the joint cartilage. **CONCLUSION:** Our results indicate the effectiveness of moderate treadmill training to reduce knee joint degradation associated to improving functionality of induced knee OA in rats. The greater cell conservation infers that this dose favored the attenuation of the degenerative process.

KEYWORDS: Osteoarthritis, Joint Cartilage, Oxidative Stress, Cytokine, Physical Exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação ampliada da cartilagem e sua constituição..... | 19 |
| Figura 2. Mudança estrutural e remodelação óssea..... | 20 |
| Figura 3. Patogênese da Osteoartrite..... | 22 |
| Figura 4. Procedimento de indução química de osteoartrite de joelho..... | 30 |
| Figura 5. Medida de diâmetro articular..... | 31 |
| Figura 6. Treinamento moderado de baixo impacto em esteira..... | 32 |
| Figura 7. Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod test)..... | 33 |
| Figura 8. Ilustração do deslocamento em plataforma de 100cm..... | 33 |
| Figura 9. Delineamento do estudo..... | 37 |
| Figura 10. Medidas de diâmetro articular durante 8 semanas..... | 39 |
| Figura 11. Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo..... | 40 |
| Figura 12. Peso corporal dos animais durante o período de treinamento..... | 40 |
| Figura 13. Teste progressivo de esforço máximo em esteira..... | 41 |
| Figura 14. Avaliação das concentrações de citocinas locais..... | 42 |
| Figura 15. Testes de avaliação de desempenho motor e físico funcional de ratos..... | 43 |
| Figura 16. Concentração do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no macerado de cápsula articular..... | 44 |
| Figura 17. Quantificação das células no terço médio do fêmur..... | 45 |
| Figura 18. Representação histológica da população de células..... | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Protocolo de treinamento progressivo..... | 32 |
| Tabela 2. Análise de regressão linear múltipla <i>stepwise</i> | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Osteoartrite | 16 |
| 1.2 Estrutura Articular | 18 |
| 1.3 Fisiopatologia | 20 |
| 1.4 Tratamento farmacológico para osteoartrite | 23 |
| 1.4.1 Exercício físico e osteoartrite de joelho | 24 |
| 1.5 Modelos animais | 25 |
| 1.5.1 Modelo Monoiodoacetato de Sódio (MIA) | 26 |
| | |
| 2.0 HIPÓTESE | 27 |
| | |
| 3.0 OBJETIVO | 28 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| | |
| 4.0 MATERIAIS E MÉTODO | 29 |
| 4.1 Animais | 29 |
| 4.1.1 Teste máximo de exercício progressivo até a fadiga em esteira | 30 |
| 4.1.2 Indução | 30 |
| 4.1.3 Avaliação de edema | 31 |
| 4.1.4 Treinamento físico de intensidade moderada em esteira | 31 |
| 4.1.5 Avaliação da atividade motora | 32 |
| 4.1.6 Teste de deslocamento em plataforma de 100cm | 33 |
| 4.1.9 Lavado articular | 34 |
| 4.2.0 Cápsula articular | 34 |
| 4.2.1 Quantificação de citocinas inflamatórias e neurotrofina | 34 |
| 4.2.2 Determinação das concentrações plasmáticas de TBARS | 35 |
| 4.2.3 A capacidade antioxidante total | 36 |
| 4.2.4 Classificação dos cortes histológicos | 36 |
| 4.2.5 Quantificação do número de células | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 5. ANÁLISE ESTÁTISTICA..... | 38 |
| 6. RESULTADOS..... | 38 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 46 |
| 8. CONCLUSÃO..... | 50 |
| REFERÊNCIAS..... | 51 |
| ANEXO A- Parecer de aprovação do CEUA..... | 59 |
| ANEXO B- Artigo para submissão – Moderate exercise program modulates joint biomarkers and improves functional adaptations on knee osteoarthritis in rats..... | 60 |

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é a doença articular caracterizada pelo aumento permanente e constante da degradação de componentes da cartilagem, gerando dor, rigidez e alterações estruturais que culminam em limitações funcionais e piora na qualidade de vida do paciente (FELSON 2004; BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2017). Considerada a forma mais comum de doença articular em adultos (FELSON 2004), é uma das dez doenças mais incapacitantes nos países desenvolvidos (HELMICK *et al.*, 2008). As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), são de que em todo o mundo 9,6% dos homens e 18% das mulheres com idade superior a 60 anos apresentarão quadro clínico sintomático. Além disso, 80% dos portadores de osteoartrite apresentarão limitações de movimento e 25% não poderão executar suas principais atividades da vida diária.

Sua etiologia é multifatorial e pode estar relacionada à traumas constantes na cartilagem articular decorrentes de práticas de alto impacto (ROJAS-ORTEGA *et al.*, 2015), sobrepeso e obesidade acarretando sobrecarga articular (ABRUZZO *et al.*, 2013), fatores genéticos, bioquímicos relacionados à composição do colágeno e outros componentes estruturais do tecido (URBAN, 1994), além de fatores hormonais e do envelhecimento (COOPER *et al.*, 2013). Evidências recentes, sugerem o papel inflamatório (ATTUR *et al.*, 2013) e o estresse oxidativo como fatores de agravo para o desenvolvimento e progressão da osteoartrite (HENROTIN *et al.* 2003; LOESER, 2011).

. Acredita-se que o estresse oxidativo, danificaria os componentes celulares relacionados com a manutenção da matriz da cartilagem como ácidos nucleicos, proteoglicanos e colágeno, bem como oxidaria proteínas alterando as suas funções biológicas (HENROTIN *et al.*, 2003; YUDOH *et al.*, 2005). Evidências recentes, também apontam o estresse oxidativo como fator causal primário na sua patogênese visto que, pacientes com osteoartrite comparados com controles hígidos apresentam componentes oxidantes aumentados e componentes antioxidantes reduzidos sistemicamente (ABRUZZO *et al.*, 2013; GERMANOU *et al.*, 2013). Somado a isto, considerando que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem promover danos oxidativos em diversos componentes articulares, o aumento das concentrações de EROs poderia danificar o DNA mitocondrial, contribuindo com o desequilíbrio da homeostase da matriz extracelular e apoptose dos condrócitos (YUDOH *et al.*, 2005, CIFUENTES *et al.*, 2010). Além disso, deve-se considerar que o estresse oxidativo,

além de promover a destruição da cartilagem, parece desencadear cascata de eventos neuroinflamatórios que influenciam diretamente a progressão da doença (REED *et al.*, 2014).

O estado inflamatório aumentado resultaria em perda da integridade da matriz extracelular, danos oxidativos e, finalmente, morte de condrócitos. Na osteoartrite, citocinas pró-inflamatórias presentes na cavidade articular alteram o equilíbrio em favor da degradação da cartilagem (ABRAMSON e ATTUR, 2009; SOKOLOVE e LEPUS, 2013; WOJDASIEWICZ *et al.*, 2014). Alguns dos principais fatores neste processo são as interleucinas (IL) IL1, IL6, o fator de necrose tumoral (TNF) (PELLETIER *et al.*, 2001), e metaloproteases da matriz (MMP) (GOLDRING e GOLDRING, 2004; MOILANEN *et al.*, 2009).

Até onde se sabe, não há relatos na literatura que demonstrem a eficácia de tratamentos que revertam os danos causados na articulação ou retardam de forma eficaz a progressão da doença. Atualmente, as abordagens terapêuticas são pautadas principalmente no controle da dor, e conseqüentemente, atuando na melhora da funcionalidade comprometida por fatores relacionados a causas álgicas (ALTMAN, 2010). O uso crônico de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINES) é a terapêutica medicamentosa mais comum e primariamente prescrita para o controle dos sintomas; entretanto, apresenta diversos efeitos sistêmicos adversos, incluindo ulceração gastrointestinal, inibição da agregação plaquetária e alterações no fluxo renal (KENNA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2008; TRELLE *et al.*, 2011).

Como alternativa para minimizar a progressão da doença e controlar a dor, função física e qualidade de vida, a literatura vigente aponta efeito de condroproteção do treinamento constituído por exercício físico de intensidade moderada realizado no solo. Este efeito, parece estar relacionado com a ação da transdução dos sinais mecânicos das atividades de impacto sobre a preservação dos proteoglicanos um dos constituintes da cartilagem articular e seu efeito parece ser positivo sobre os condrócitos (QUINN *et al.*, 1998; FEHRENBACHER *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2013;). De acordo com Roman-Blas (2006), o estresse mecânico de baixa magnitude, descrito ao longo da dissertação como “exercício moderado de baixo impacto” parece suprimir as vias de formação de IL1 e TNF, mediadores inflamatórios envolvidos com degradação articular. Conseqüente à redução local (articular) destes mediadores inflamatórios, haveria regulação positiva a favor da síntese de proteoglicanas e colágeno. Somado a isto, ocorreriam ajustes no sistema de defesa antioxidante endógena (GALOIS *et al.*, 2003, CIFUENTES *et al.*, 2010).

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que o treinamento constituído por exercício físico moderado promoveu mudanças nas concentrações sanguíneas dos

receptores solúveis para o fator de necrose tumoral (TNF) relacionadas com melhora funcional. Além disso, evidenciou relação direta entre concentrações plasmáticas elevadas de BDNF com melhora em parâmetros clínicos em sujeitos com osteoartrite de joelho (GOMES *et al.*, 2012; SIMÃO *et al.*, 2014). Apesar da literatura atual apontar efeitos positivos do treinamento com exercício físico em biomarcadores sistêmicos e de funcionalidade em sujeitos com osteoartrite de joelho, permanece lacuna no que tange o efeito condroprotetor relacionado a funcionalidade desta estratégia terapêutica mencionada.

1.1 Osteoartrite

A osteoartrite é uma doença crônica causada por degeneração articular progressiva e, conseqüente, perda de superfície da cartilagem articular, comprometendo assim integridade do tecido. As alterações estruturais e/ou funcionais atingem não somente os componentes articulares, a saber, a cartilagem propriamente dita, sinóvia e líquido sinovial, como também o atinge os tecidos adjacentes incluindo tendões, ligamentos, meniscos, cápsula articular e osso subcondral. (PEREIRA *et al.*, 2011; LITWIC *et al.*, 2013; BERENBAUM, 2013).

O processo degenerativo resulta em uma experiência algica persistente que culmina em limitação funcional, impactando, significativamente, a execução de tarefas diárias e instrumentais dos indivíduos que apresentam osteoartrite (MARCH e BAGGA 2004; MICHAUD *et al.*, 2006; LOSINA *et al.*, 2011). No Brasil, a osteoartrite ocupa o terceiro lugar entre as causas de pagamento de seguros da Previdência Social, representando 7,5% de todos os afastamentos de trabalho. É a segunda doença entre as que justificam auxílio inicial e auxílio-doença e a quarta com 6,2% a determinar as aposentadorias. Além disso, representa uma das principais causas de incapacidade e morbidade em pessoas com 45 anos de idade.

Toda articulação sinovial é susceptível à osteoartrite. Entretanto, articulações submetidas a situações de sobrecarga e imposição de impacto como tornozelos, quadris e joelhos apresentam maior prevalência na ocorrência de osteoartrite. Sua etiologia é multifatorial e não está totalmente elucidada. Sabe-se que fatores locais como sobrecarga ou condições biomecânicas que alteram a distribuição de forças sob a superfície articular como deformidade por traumas repetitivos na articulação, sarcopenia e desnutrição, afetam os vetores de forças aplicadas à articulação gerando processo de desgaste (RADIN e ROSE, 1986, BURR 2004, BULLOUGH, 2004) e início de apoptose de condrócitos.

A ocorrência da osteoartrite pode estar relacionada à diversos fatores sendo que esses, responsáveis por desencadear o processo degenerativo, seja por causas mecânicas, ou até mesmo, por modificações na composição bioquímica do compartimento intra-articular, os fatores bioquímicos estão relacionados à ação das enzimas degradativas, conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMPs), responsáveis por clivar o colágeno e proteoglicanos (FEHRENBACHER *et al.*, 2003; LOESER *et al.*, 2012; HUI *et al.*, 2014; REED *et al.*, 2014; ASSIS *et al.*, 2016), elementos constituintes da cartilagem e que determinam a funcionalidade da estrutura. Em um estudo caso controle de Valdes (2006) foram encontradas associações entre polimorfismos de 12 genes relacionando-os a alterações clínicas e radiológicas em pacientes com OA, assim, o fator genético pode também contribuir com o desequilíbrio a favor do catabolismo, consequente apoptose de condrócitos e modificação na a composição do colágeno. Além destes, outros fatores inerentes ao indivíduo como a idade, gênero e etnia estão relacionados com o aumento da incidência da osteoartrite. Jordan (2007), analisou imagens radiográficas da população americana dividida entre afrodescendentes e brancos, as pessoas negras tinham uma prevalência ligeiramente maior de queixa sintomática de joelho e alterações radiológicas quando comparados a indivíduos brancos, na população estudada, as alterações radiográficas graves afetaram cerca de 1% das pessoas com osteoartrite com idade entre 25 e 34 anos, este número aumentou em torno de 50% na população com a faixa etária de 75 anos ou mais, evidenciando assim a idade como um fator de risco para OA de joelho. Além disso, observou que a prevalência foi maior em idosos e mulheres. Neste contexto, sabe-se que mulheres pós-menopausa são mais susceptíveis à ocorrência de osteoartrite em função à privação hormonal do estrógeno. (COOPER *et al.*, 2013).

A articulação do joelho, devido à sua característica de redistribuição de cargas e várias inserções musculares que contribuem para a ação de forças de compressão e tensão (HELMICK *et al.*, 2008; WISE *et al.*, 2012), favorece o estudo desse segmento com foco em abordagens que auxiliam na compreensão dos processos articulares degenerativos e inflamatórios. Embora a fisiopatologia da degeneração na osteoartrite é amplamente estudada, ainda há uma lacuna na literatura sobre seu desenvolvimento inicial à síndrome clínica sintomática da osteoartrite. A degeneração articular representa o início insidioso, sendo que a procura por assistência médica ocorrerá em função do aparecimento de sintomas de dor, desconforto e rigidez articular (HOCHBERG, 2013). Portanto, é de extrema relevância estudar abordagens de prevenção e/ou terapêuticas que retardam ou impeçam sua progressão ainda na fase inicial.

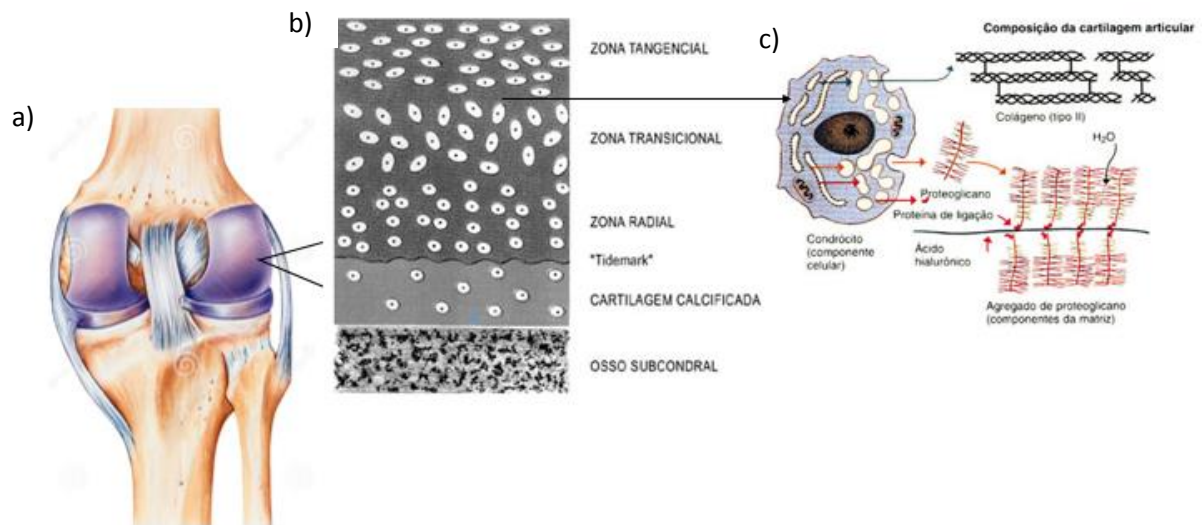
1.2 Estrutura Articular

A articulação sinovial é composta basicamente de dois segmentos ósseos interligados por tecidos conectivos e separados por estruturas, cuja finalidade, é estabelecer movimentos propiciando funcionalidade aos membros. A cartilagem articular é o tecido conjuntivo protetor que reveste as extremidades dos ossos longos, atuando como um amortecedor reduzindo, desta forma, o atrito durante o movimento. Quando presente, a osteoartrite leva a uma fibrilação do tecido cartilaginoso, seguido por fissuras, gerando a diminuição da espessura da cartilagem e consequente perda progressiva da cartilagem articular, gerando erosões no tecido e exposição do osso subcondral.

A cartilagem articular hialina é constituída por quatro camadas diferenciadas pela forma das células, estas, denominadas condrócitos. Em termos didáticos, as camadas da cartilagem podem ser divididas em zona superficial, média (transição), profunda e calcificada. As três primeiras camadas compõem a cartilagem não calcificada e a fina região que determina essa divisão é denominada *tidemark* (Fig.1). Estas, por sua vez, diferenciam-se conforme o teor de proteoglicanos e disposição das fibras de colágeno.

O osso subcondral, como a própria terminologia infere, é a estrutura encontrada abaixo da última zona de cartilagem calcificada e é dividido em placa cortical, zona trabecular e osso subarticular. Há uma estreita relação entre a cartilagem articular e o osso subcondral, essa proximidade implica não somente na localização, mas também no mecanismo principal de reparação celular, sendo responsável também, pela manutenção da celularidade, fato esse, que contribui com a função fisiológica das articulações. Portanto, o desequilíbrio no estado mecânico e/ou biológico do osso subcondral pode alterar a manutenção da matriz extracelular e gerar disfunções na própria cartilagem, contribuindo para sua degradação progressiva que culmina em perda funcional da estrutura (ROMAN-BLAS *et al.*, 2009; GOLDRING e GOLDRING, 2004 ;HERRERO-BEAUMONT, 2013).

Figura 1. Representação ampliada da cartilagem e sua constituição.

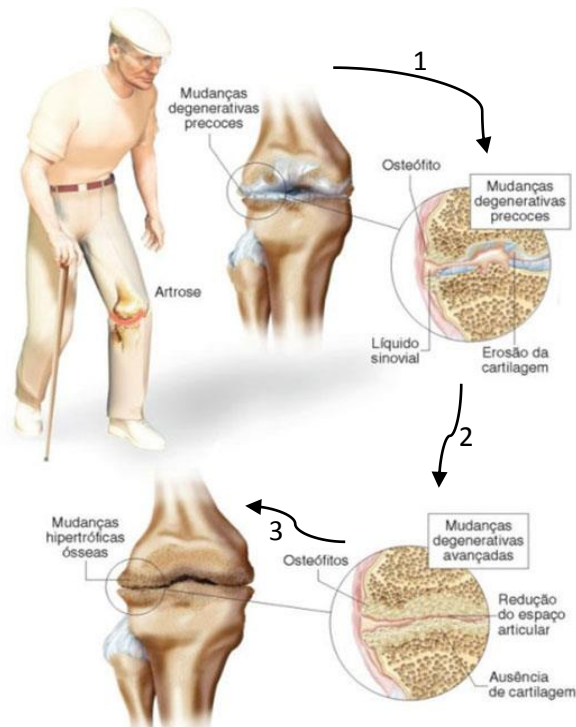


Fonte: Adaptada pela autora*. a)Articulação tibiofemoral, b)estratificação da cartilagem e c)composição da cartilagem articular. H₂O=Água. a):Disponível em:<<https://pt.dreamstime.com/ilustra%C3%A7%C3%A3o-stock-joelho-anatomia-vista-dorsal-image82091983>> acesso em: mar. 2017. b): Disponível em :<<http://fisioliferodrigorivelino.blogspot.com.br/2011/04/dad-cartilagem-articular.html> > acesso jun.2017.c): Disponível em:< <https://www.articulacoes.com.br/editorial/102/o-movimento>> acesso em: mar. 2017.

No estado de repouso da cartilagem adulta saudável, os condrócitos estão inativos e há pouca deposição de cartilagem na matriz. Martinek (2003) descreveu de maneira didática o início do processo degenerativo da osteoartrite iniciado em alterações do metabolismo dos condrócitos. O aumento desse catabolismo metabólico, pode ser visto como resposta a um estresse, visando restituir a remodelação da matriz, essas células aumentam seu metabolismo a favor do aumento de produção de proteínas e, nesse processo, as enzimas de degradação também podem, eventualmente, ser liberadas (ATTUR *et al.*, 2013). O aumento do teor de água concomitante à redução de proteínas resulta em comprometimento funcional da elasticidade e absorção de impacto na cartilagem. Posteriormente, as unidades funcionais (condrócitos) aumentam sua atividade metabólica na tentativa de reparar o dano e reestabelecer a homeostase, proliferando e aumentando sua atividade metabólica resultando na formação de conglomerados de células, denominados *clusters* com moléculas de matriz recém-sintetizadas. Essa tentativa de manutenção da taxa de componentes, frente à diminuição da síntese pode durar anos e nesta fase a doença pode ser assintomática. Na última fase, os condrócitos já não podem metabolizar sintetizando a matriz extracelular, ocorrendo, desta forma, o início da fissura da superfície articular, podendo ocorrer perda completa de cartilagem, expondo o osso subcondral e iniciando a fase álgica da osteoartrite (LORENZ e RICHTER, 2006).

Todos esses fatores culminarão em alteração da arquitetura e das propriedades da zona cortical e do osso trabecular. Essas mudanças resultarão no desenvolvimento de esclerose óssea ou cistos, espessamento da placa óssea, remodelamento do osso trabecular com deposição de osteófitos (fig.2).

Figura 2. Mudança estrutural e remodelação óssea.



Legenda: 1-Mudanças degenerativas precoces, alteram através de modificação do metabolismo de condrócitos o conteúdo do líquido sinovial, enzimas degradativas são ativadas e inicia-se o processo de erosão da cartilagem.2- Mudanças degenerativas avançadas se instalam com redução do espaço articular, também não há mais revestimento da superfície óssea pela cartilagem, a remodelação óssea é iniciada pela formação de osteófitos. 3- Na última fase, ocorre completa remodelação e inicia o processo de fusão das estruturas, desencadeando a limitação funcional em seu modo mais grave. Fonte: Disponível em:< <http://adrianoleonardi.com.br/artrose-do-joelho-causas-diagnostico-e-tratamentos/>> acesso em: abr. 2017

1.3 Fisiopatologia

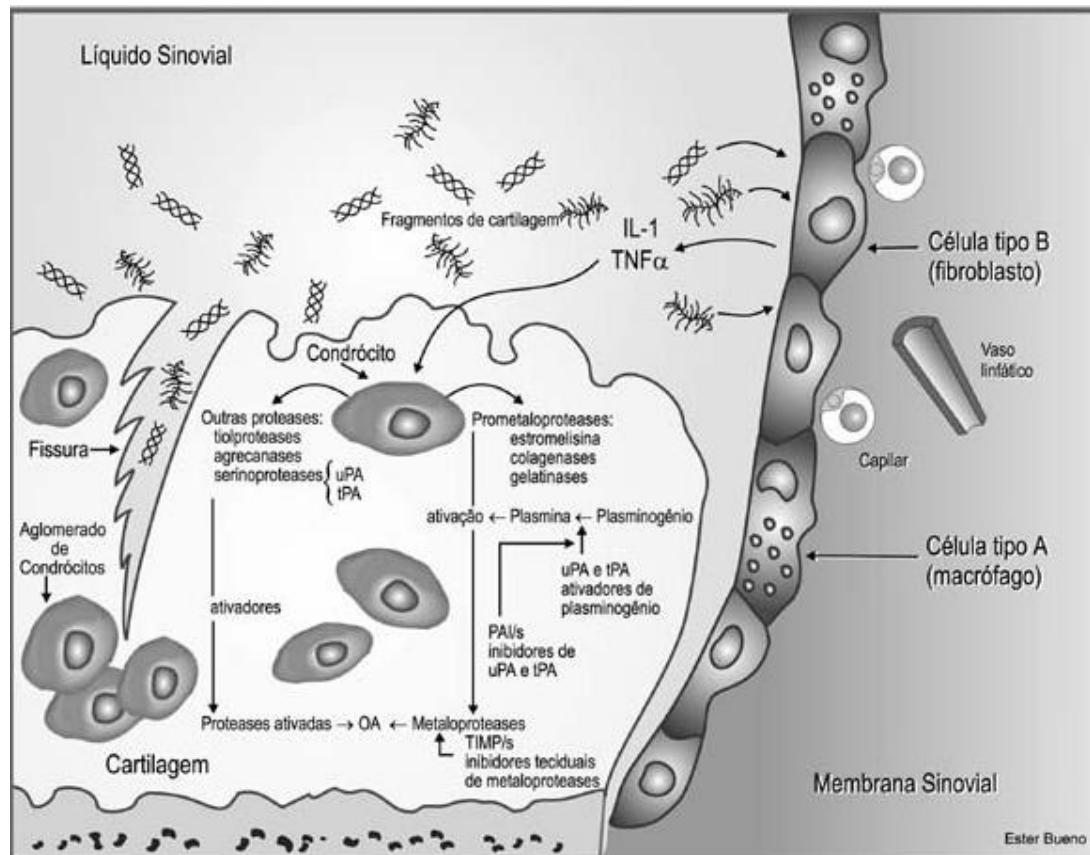
Evidências apontam o estresse oxidativo e o conseqüente aumento das espécies reativas de oxigênio, estado inflamatório e apoptose de condrócitos como fatores causais da patogênese da osteoartrite. Além disso, o estresse oxidativo e o aumento do perfil inflamatório parecem desencadear cascata de eventos que promovem a destruição da cartilagem, a

progressão da doença e a incapacidade articular (GALOIS *et al.*, 2004; HENROTIN *et al.*, 2003; LOESER 2012; ATTUR *et al.*, 2015; ATTUR *et al.*, 2013).

Sabe-se que processo de desenvolvimento da osteoartrite, decorre do envolvimento global das estruturas articulares, bem como remodelação dos tecidos adjacentes, e que esse processo é conduzido por uma série de mediadores inflamatórios. Todavia, ainda não está totalmente elucidado se os eventos catabólicos na cartilagem precedem aqueles que ocorrem no osso e sinóvia ou se ocorrem simultaneamente. As alterações na cartilagem, osso subcondral e sinóvia estão interligadas e são essenciais para a compreensão da patogênese de degradação progressiva da cartilagem na osteoartrite (WALSH *et al.*, 2007, WALSH *et al.*, 2010).

A inflamação figura hoje como o fator de progressão e manutenção do estado degenerativo articular e sabe-se que está relacionada à patogênese da osteoartrite (SCANZELLO e GOLDRING, 2012, SOHN *et al.*, 2012). A inflamação pode resultar da fagocitose dos fragmentos de cartilagem e células sinoviais. As citocinas liberadas podem inibir a síntese da matriz e cartilagem, além de clivar componentes estruturais fundamentais, ativando a ação da metaloproteinase 13 (MMP13) sobre o colágeno tipo II (GOLDRING e MARCU, 2009; GORANOV, 2007). Assim, a degeneração da matriz cartilaginosa pode resultar em fragmentos que migram para a cavidade articular fazendo com que os condrócitos, que expressam receptores para componentes da matriz extracelular, detectem a lesão e iniciem a síntese e liberação de proteinases degradantes de matriz. Neste cenário, as citocinas inflamatórias mais atuantes na degradação articular são IL1, e fator de necrose tumoral (TNF) (MARTEL- PELLETIER, 2004; FINN *et al.* 2014; LI *et al.* 2015). Assim, esses mediadores inflamatórios, produzidos e também liberados pelos sinoviócitos, comprometem a homeostase da cartilagem, aumentando a liberação das MMPs (LOESER *et al.*, 2012, HUI *et al.*, 2014; FEHRENBACHER *et al.*, 2003), e diminuindo a secreção dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPS) responsáveis pelo controle da atividade das MMPs. Esse desequilíbrio na regulação de MMPs e TIMPS pode conduzir a um aumento da degeneração articular (DAVIDSON *et al.*, 2006, KASHIWAGI *et al.*, 2001, FRANSES *et al.*, 2010).

Figura 3. Patogênese da Osteoartrite



Fonte: Moreira Jr. Editora. Disponível em: Fonte: Moreira Jr. Editora: disponível em <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2031>

A sinóvia é outro tecido estudado na patogênese da osteoartrite, podendo ser definida como uma zona de tecido fibrocolágeno constituído por adipócitos, fibroblastos, mastócitos e macrófagos (WENHAM e CONAGHAN, 2010). É altamente vascularizada e innervada por toda a sublinha do tecido fibrocartilagenoso (WALSH et al., 2007). Além disso, é um tecido que expressa o fator neurotrófico derivado pelo cérebro (GRIMSHOLM et al. 2008) que pode influenciar na via de transição de células da cartilagem (HUTCHISON, 2012).

Na fase tardia da osteoartrite ocorrem mudanças estruturais pronunciadas nos tecidos articulares (LOEUILLE et al., 2005). Estas alterações incluem proliferação e espessamento da camada de revestimento, bem como aumento do número de canais vasculares e infiltração de células inflamatórias (HARAOUI et al., 1991). A deposição superficial de fibrina e a fibrose estão presentes no estágio tardio da osteoartrite (LOEUILLE et al, 2005). Esses fatores culminam diretamente na funcionalidade, uma vez que a rigidez decorrente da fibrose pode diminuir a mobilidade e reduzir a amplitude de movimento funcional da articulação acometida.

1.4 Tratamento farmacológico para osteoartrite

A osteoartrite ainda não tem cura. Embora os tratamentos atuais visem diminuir a sintomatologia de queixa do paciente, até onde se sabe, nenhum tratamento age regenerando a estrutura degradada. Atualmente, os tratamentos são dirigidos a modificar os sinais e sintomas, primariamente dor e inflamação, a fim de melhorar a qualidade de vida, função e mobilidade, tentando, desta forma, retardar a progressão da doença pelo controle inflamatório (ALTMAN, 2010). Assim, não se pode reportar uma única terapia suficientemente adequada para osteoartrite e as diretrizes recomendam a associação de abordagens educativas da doença e terapêutica farmacológica.

Os tratamentos farmacológicos são recomendados para o manejo do quadro álgico e incluem analgésicos tradicionais ou opióides (casos de dor persistente e grave), concomitantes ou não ao uso de anti-inflamatórios (corticoides ou não esteroidais). Para pacientes intolerantes ou não responsivos a AINEs, terapia medicamentosa de primeira linha, terapias invasivas, como injeção intra-articular de corticosteroides, são prescritas (ZHANG et al., 2008), esses fármacos têm como função o controle das queixas álgicas e controle do quadro inflamatório característico da doença. (MICHAEL *et al.*, 2010). Toda a estratégia de controle farmacológico requer extremo cuidado, uma vez que esses tratamentos apresentam diversos efeitos adversos e a segurança para uso em longo prazo é questionável.

Entretanto, apesar de positivo para o tratamento sintomático de osteoartrite demonstrado pela comparação de dois fármacos em parâmetros inflamatórios no tecido sinovial de pacientes com osteoartrite (PASQUALI RONCHETTI *et al.*, 2001), não há abordagens terapêutica de qualquer tipo que evidenciem a modificação da doença em parâmetros locais e sistêmicos impactando em tarefas de desempenho físico funcionais, além disso, a efetividade da terapia medicamentosa é maior nas fases iniciais da doença quando comparada a fases tardias. Portanto, os tratamentos farmacológicos disponíveis para osteoartrite têm eficácia limitada, nem sempre a analgesia é efetiva em todos os pacientes. Finalmente, em casos mais graves, a artroplastia pode restaurar a função de mobilidade da articulação, mas trata-se de uma intervenção cirúrgica agressiva que depende da condição de saúde e recuperação, além de ser onerosa para o sistema público de saúde.

1.4.1 Exercício físico e osteoartrite de joelho

Várias intervenções têm sido utilizadas para melhorar o desempenho físico e funcional em pacientes com osteoartrite de joelho. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o efeito de abordagens terapêuticas que minimizam o efeito colateral da terapia medicamentosa, o exercício físico moderado em esteira, tem sido utilizado como alternativa para minimizar a progressão da doença. Visto que, além de ter boa adesão pelos indivíduos, conta com a vantagem de sua implementação ser de baixo custo.

A literatura vigente evidencia que a prática regular de exercício físico age ajustando o sistema endógeno de defesa antioxidante (ABRUZZO *et al.*, 2013; GERMANOU *et al.*, 2013), além de atuar diretamente na liberação local de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) as neurotrofinas, incluindo o BDNF, parecem agir diretamente na diferenciação de condrócitos, por terem papel de ativação da via que promove a transição do estado proliferativo para um estado de diferenciação nessas células (HUTCHISON, 2012). Além disso, há relatos a favor do efeito condroprotetor do treinamento físico com impacto articular de intensidade moderada. Esse efeito parece estar relacionado à ação da transdução do estímulo mecânico das atividades de impacto (O'HARA *et al.*, 1990) sobre a preservação dos proteoglicanos constituintes da cartilagem e regulação do metabolismo dos condrócitos (IJIMA *et al.*, 2015). Segundo Roman-Blas, 2006, a tensão mecânica de baixa magnitude parece suprimir a via de liberação de IL1 e TNF intra-articular, mediadores inflamatórios envolvidos na degradação articular, favorecendo, desta forma, a regulação de síntese de proteoglicanos e colágeno.

Nosso grupo de estudo demonstrou que um programa de treinamento com exercício físico de intensidade moderada promove mudanças nas concentrações sistêmicas de receptores solúveis de fatores de necrose tumoral (TNF) relacionadas à melhora funcional. Além disso, evidenciamos relação entre concentração plasmática de BDNF e melhora em parâmetros clínicos em pacientes com osteoartrite de joelho (GOMES *et al.*, 2012; SIMÃO *et al.*, 2014). Apesar dos efeitos positivos do treinamento com exercício físico em sujeitos com osteoartrite de joelho, há escassez de informações acerca do real efeito condroprotetor articular e sua associação com melhora físico-funcional. Assim, até onde se sabe, não há evidências suficientes sobre o efeito modulador do treino com exercício físico de intensidade moderada em esteira em parâmetros locais de degradação articular e possível relação com desempenho funcional.

1.5 Modelos animais

O uso do modelo animal tem sido fundamental para superar o desafio de estudar a forma e desenvolvimento da osteoartrite, principalmente em sua fase inicial (McCoy 2015; Piel *et al.*, 2014; Poole *et al.*, 2010), bem como avaliar o efeito de estratégias terapêuticas em parâmetros locais da doença, principalmente para avaliar em biomarcadores de degradação articular e alterações estruturais intra-articulares. Assim, o estudo utilizando modelo animal auxilia a compreender mecanismos e estudar alterações compartimentais (intra-articular) da doença, permitindo, desta forma, complementar ou substanciar estudos realizados com seres humanos.

Com relação aos modelos com animais utilizados para o estudo da doença em questão, em geral, utilizam-se equínos, suínos, coelhos, cães, ratos, camundongos e a escolha do modelo depende do objetivo do trabalho, facilidade do manejo em biotério, custo operacional para manutenção das cobaias e volume desejado de material biológico. Entre os modelos de indução da osteoartrite em animais, cita-se a indução pós-trauma pela cirurgia, lesão meniscal medial induzida cirurgicamente, transecção do ligamento cruzado anterior, desestabilização invasiva do menisco mediano e indução química intra-articular com monoiodoacetato de sódio (MIA). A vantagem da indução química deve-se ao fato da rapidez da instalação do quadro degenerativo e pela recuperação do animal pós indução.

Não existe um modelo animal de osteoartrite que retrata verdadeiramente a doença como seu curso em humanos (MCCOY, 2015). Cada modelo apresenta um aspecto diferente de resposta, sendo então primordial estabelecer a pergunta a ser respondida previamente a escolha do modelo a ser implementado para se obter melhor compreensão da osteoartrite (BERG, 2009). Os critérios a serem estudados precisam à escolha do modelo com foco na eficiência de translocação dos resultados para predição terapêutica em seres humanos. Em outras palavras, os pontos norteadores para a escolha do modelo são: 1). Eficácia do modelo, isto é, o que é eficaz no animal deve ser eficaz quando reproduzido em um estudo em humanos; 2). A semelhança da patogênese com o curso da doença em humanos considerando todos os tecidos afetados; 3). Vantagens do modelo considerando custo, facilidade para manipulação, tempo para avaliar os efeitos da doença (BENDELE *et al.*, 1999, LITTLE e SMITH, 2008).

São amplamente mais aceitos os modelos de osteoartrite de ocorrência natural (espontânea) visto que podem mimetizar as causas, características histopatológicas e a real progressão da doença. Assim, estes modelos seriam melhores do que os modelos cirúrgicos

ou químicos (POOLE *et al.*, 2010). No entanto, como em seres humanos, o modelo animal com ocorrência espontânea da doença apresenta alto grau de variabilidade entre animais, especialmente com relação ao início de surgimento do processo, bem como na taxa de degradação articular e extensão da lesão. Como resultado, há limitação no que se refere à heterogeneidade demandando grupo experimental com número elevado de animais.

Além do exposto, outra desvantagem do modelo animal refere-se ao tamanho da articulação dos roedores visto que fornece volume final reduzido para as análises apesar da alta aplicabilidade para estudos *in vivo* e *in vitro*.

1.5.1 Modelo Monoiodoacetato de Sódio (MIA)

O MIA é um inibidor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Seu mecanismo de ação é a inibição da glicólise. A injeção intra-articular leva à destruição da cartilagem em qualquer espécie. Sua ação é dose dependente, em diversos estudos utilizando diferentes concentrações do indutor, as extensões das áreas de lesão e morte celular em todas as camadas que constituem a cartilagem foram evidenciadas e mais significativas em concentrações mais elevadas do MIA (COMBE *et al.* 2004; SCHUELERT e MCDUGALL, 2009; SCHUELERT e MCDUGALL, 2009; LIU *et al.* 2011; OGBONNA *et al.* 2015).

A sequência de eventos assemelha-se à osteoartrite humana, no modelo por MIA também ocorre formação de osteófitos, perda progressiva de proteoglicanos e atrofia da rede de colágeno. A fibrilação ocorre em uma fase posterior, assim como a reabsorção da matriz e degradação do colágeno e do osso subcondral. O modelo de indução por MIA é extremamente útil no que diz respeito a avaliação de agentes que inibem a decomposição da matriz e o processo de reparo (BENDELE, 2001).

Até onde se sabe, as evidências são insuficientes apontando efeito modulador do treinamento físico com exercício de intensidade moderada com impacto em parâmetros locais de degradação articular e sua relação com desempenho físico-funcional na osteoartrite de joelho em humanos. Assim, o uso de modelo animal, por permitir avaliar localmente os eventos relacionados com esta afecção crônica, permitindo, desta forma, estudar eventos de degradação articular e mudanças estruturais articulares (POOLE *et al.*, 2010; PIEL *et al.*, 2014), foi o escolhido para desenvolver o presente estudo.

2. HIPÓTESE

Neste contexto, elaboramos a hipótese de que o treinamento com exercício físico de intensidade moderada modularia localmente aspectos inflamatórios a favor de balanço no perfil oxidativo sistêmico e do controle do processo degenerativo no joelho de ratos com osteoartrite induzida repercutindo na modulação positiva nas concentrações de marcadores de degradação articular explicar a manutenção celular e conseqüentemente na melhora no desempenho físico e funcionalidade.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do treinamento com exercício físico de intensidade moderada na esteira em biomarcadores neuroinflamatórios (BDNF, TNF, IL1, IL6, IL10) e aspectos histológicos articulares (números de condrócitos), perfil oxidativo sistêmico (TBARS e FRAP), desempenho físico-funcional (avaliado pelos testes Rotarod e tempo e número de falhas deslocamento em plataforma de 100cm) em ratos com osteoartrite de joelho induzida por moniodosteoartritecetato de sódio.

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar associação entre aspectos articulares e desempenho físico-funcional.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais

Visando seguir as regras do CONCEA que orienta o uso do menor número possível de animais (ou quantidade de tecido animal) para se obter resultado estatístico com alto poder e tamanho de efeito moderado (BRASIL, 2015), foi realizado cálculo amostral a partir da equação estabelecida por Jekel, Katz e Berry, 2005, conforme abaixo descrita.

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \times 2 \times dp^2}{d^2}$$

Onde:

$Z\alpha$: nível de significância;

$Z\beta$: poder do teste

dp : desvio padrão;

d : tamanho do efeito

Para este cálculo, a variável escolhida foi o dano oxidativo por meio da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para isto, utilizou-se os dados informados no estudo (CIFUENTES, 2009). O nível de significância adotado foi de 5% e o poder do teste de 90%. Desta forma, o cálculo amostral revelou a necessidade de 9 ratos Wistar para cada grupo experimental. Assim, foram utilizados neste estudo 27 ratos da linhagem Wistar, machos, com idade de 12 semanas (POOLE *et al.*, 2010). Os animais foram fornecidos pelo CEBIO (Centro de Bioterismo do ICB/UFMG) e mantidos em biotério apropriado (ambiente termoneutro mantido a 22°C) acondicionados em caixas plásticas padrão de polipropileno (49x34x16cm), com no máximo 3 animais por caixa, onde foram ofertadas ração para roedores (Nuvilab) e água *ad libitum* durante o período do experimento. Além disso, os animais foram familiarizados com os testes, medidas e esteira (10 m/min; 1% de inclinação; por 10 minutos; durante cinco dias consecutivos, por pelo menos uma semana antes do procedimento experimental) visando minimizar o estresse inerente aos procedimentos propostos.

4.1.1 Teste máximo de exercício progressivo até a fadiga em esteira

Foi realizado um teste máximo progressivo até a fadiga na esteira com o seguinte protocolo: Velocidade inicial de 10 m/min; 1% de inclinação; sem estímulo elétrico, com incremento de 2m/min na velocidade a cada 3 min. O teste foi interrompido quando o animal não respondia com retorno ao padrão de corrida após 5 segundos na grade da esteira e 3 estímulos mecânicos consecutivos.

4.1.2 Indução

Para a indução da osteoartrite de joelho, os animais foram anestesiados com 80mg/kg de ketamina e 15mg/kg de xilazina. Após tricotomia da região anterior da face articular tíbio femoral, utilizou-se algodão embebido em álcool 70% para assepsia no local da injeção. Para determinar o local da indução, o joelho do rato era posicionado a 90° de flexão e com auxílio de agulha hipodérmica para insulina realizava-se leve pressão para evidenciar o tendão patelar por meio do ligamento patelar. A solução de MIA foi injetada intra-articular por uma seringa 29G X 1/2 (BD Ultra-Fine™) no joelho direito na concentração de 1,2 mg de monoiodoacetato de sódio (MIA) dissolvido em 50 µL de solução salina estéril. Já no joelho controle foi injetada apenas a salina estéril no mesmo volume do induzido (50 µL).

Figura 4. Procedimento de indução química de osteoartrite de joelho.



4.1.3 Avaliação de edema

Para avaliar a formação do edema característico do modelo, o diâmetro articular do joelho foi medido nos momentos, antes da indução, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas após indução. Para avaliar possível hipotrofia no grupo induzido não treinado todos os grupos foram avaliados quanto ao diâmetro articular nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 semanas. Para a avaliação do diâmetro articular foi utilizado um paquímetro digital. Os animais foram contidos em decúbito ventral e um pesquisador treinado realizou a medida posicionando os bicos do aparelho, fixo e móvel, no sentido medial-lateral do joelho.

Figura 5. Medida do diâmetro articular.



Fonte: AGUIAR G. C. (2014).

4.1.4 Treinamento físico de intensidade moderada em esteira:

Esteira para ratos com 6 baias (Insight) foi utilizada para o treinamento do grupo osteoartrite induzida e exercício físico (OAT) (Tabela 1). A intensidade do exercício físico para o treinamento foi escolhida com base no estudo de Leandro e colaboradores (2007) que identificaram a dose utilizada (velocidade de 16 m.min⁻¹ com 1% de inclinação na esteira) como sendo de intensidade moderada, visto representar 70% do VO₂ máximo.

O treinamento foi iniciado 24 horas após a indução e teve duração de 8 semanas com a frequência de 3 vezes por semana. Os animais foram observados por todo período de treinamento e estimulados mecanicamente a retornar ao padrão de corrida sempre que permaneciam por mais de 3 segundos na grade. Os Grupos osteoartrite e SHAM foram expostos ao ambiente de exercício pelo mesmo período que o grupo osteoartrite treinado; entretanto, a esteira permaneceu desligada.

Figura 6- Treinamento moderado de baixo impacto em esteira.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 1. Protocolo de treinamento progressivo.

| Semanas | Frequência Semanal | Velocidade (m/min.) | Duração (min) |
|----------------|--------------------|---------------------|---------------|
| Familiarização | 5 | 10 | 10 |
| 1 | 3 | 16 | 30 |
| 2 | 3 | 16 | 30 |
| 3 | 3 | 16 | 30 |
| 4 | 3 | 16 | 30 |
| 5 | 3 | 16 | 50 |
| 6 | 3 | 16 | 50 |
| 7 | 3 | 16 | 50 |
| 8 | 3 | 16 | 50 |

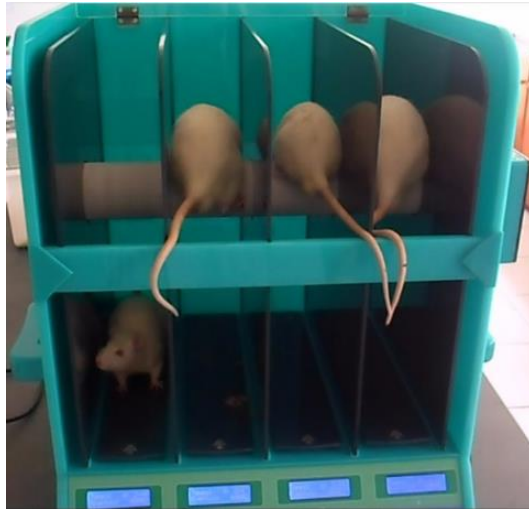
Legenda: Metros por minuto (m/min.). Minuto (min)

4.1.5 Avaliação da atividade motora

A Avaliação da funcionalidade articular, por meio do Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod test), foi realizada para verificar o controle motor dos animais. Para tanto, o animal foi posicionado em haste rotativa em velocidade constante de 8 rotações por minuto (rpm) e foi quantificado o número de quedas durante o período de 3 minutos. Para quantificar o número de quedas durante o teste, o pesquisador permaneceu em observação direta durante todo período da avaliação. Ao cair sobre a plataforma de pressão, o rato era posicionado novamente sobre a haste giratória o tempo era interrompido e reiniciado após

posicionamento do animal. Ao final do tempo era anotada a quantidade de vezes que o animal havia caído sobre a plataforma.

Figura 7- Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod test).

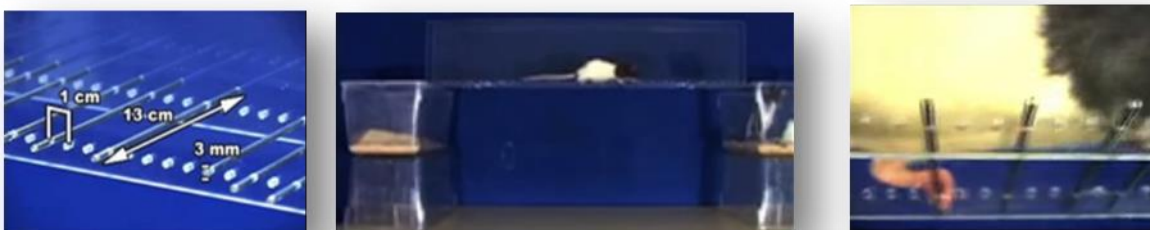


Fonte: Arquivo pessoal

4.1.6 Teste de deslocamento em plataforma de 100cm

Para avaliar o desempenho funcional ao se deslocar em curta distância, os animais foram colocados a deambular em uma plataforma com 100cm de comprimento. O animal partia de uma extremidade a outra e foram quantificados o tempo e o número de vezes que o animal pisava fora do espaço delimitado por filetes de alumínio de 3 mm de espessura. O teste foi realizado por uma única passagem registrada por vídeo e cronômetro, o tempo foi registrado e as imagens foram analisadas posteriormente para quantificar o número de falhas.

Figura 8. Ilustração do deslocamento em plataforma de 100cm.



Fonte: Adaptado de Metz G.A. e Wishaw I.Q. (2009)

4.1.7 Eutanásia e obtenção de material biológico

Após 8 semanas, todos os animais foram eutanasiados por decaptação e foram coletadas amostras biológicas para análises. Foram coletados aproximadamente 12 mL de sangue em tubos contendo EDTA e, em seguida, centrifugadas a 500xg durante 10 minutos. O soro foi aliquoteado e congelado em freezer – 80°C para análise posteriores.

4.1.9 Lavado articular

O lavado articular foi realizado pelo método de aspiração utilizando uma seringa para insulina 29G X 1/2 (BD Ultra-Fine™). Primeiramente, foi realizada higienização com álcool a 70% do joelho, a pele foi seccionada e realizou-se uma incisão no tendão patelar com uma lâmina de bisturi. Em seguida, procedeu-se com a lavagem da cavidade articular do joelho utilizando uma seringa. Após três lavagens com 20µL de PBS 3%, o lavado foi acondicionado em eppendorfs de 0,5mL que já continham 140µL de solução de extração de citocinas. Os eppendorfs foram centrifugados em temperatura de 4°C, por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante ($\pm 170 \mu\text{L}$) foi retirado, acondicionado em eppendorfs de 0,5mL, e congelados para posterior dosagem de citocinas.

4.2.0 Cápsula articular

A cápsula articular que foi removida com auxílio de uma pinça, bisturi e micro tesoura. O material foi mantido resfriado e após sua completa remoção passou por imersão em PBS, armazenado em eppendorf de 2 mL e congelado imediatamente em freezer -80°C. Para o preparo do macerado de cápsula, foram utilizados 750µL de solução para extração de citocinas em um béquer e com um homogenizador de tecidos (Tecnal, TE-103). A cápsula foi processada na velocidade 8rpm por 2 minutos. O volume obtido foi centrifugado a 3.500xg por 10 minutos a 4°C e armazenado em freezer para análise da concentração de citocinas e BDNF.

4.2.1 Quantificação de citocinas inflamatórias e neurotrofina

O método de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é um ensaio imunoenzimático, por princípio de interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). No presente estudo,

a técnica foi realizada para quantificar a concentração das citocinas IL-10, IL-1 β , TNF- α no lavado articular. Para avaliar as concentrações de BDNF foi utilizado o macerado da cápsula articular.

Em uma microplaca com 96 poços, os anticorpos monoclonais (100 μ L) contra as citocinas e os receptores a serem dosados foram adicionados a cada poço e incubados por 12 horas. Anticorpos não absorvidos pelas placas foram descartados por inversão e por sucessivas lavagens em PBS - *Tween*, seguidos pelo bloqueio com solução PBS - BSA 1% (200 μ L/poço), por no mínimo 2 horas. Após o bloqueio, a placa foi lavada, as amostras foram adicionadas (100 μ L) e incubadas por 12 horas. Posterior à incubação, foi realizada nova lavagem da placa e os anticorpos secundários diluídos em PBS - BSA 0,1% foram adicionados e incubados por duas horas. Finalmente, a estreptavidina ligada a peroxidase em PBS - BSA 0,1% foi adicionada (100 μ L) à placa, mantida sob agitação por 30 minutos e o cromógeno OPD (0-phenylenediamine) na diluição de 4 mg para 10 mL de tampão citrato, foi adicionado a cada poço (100 μ L) em adição à água oxigenada de 30 volumes (H₂O₂ - 2 μ L/placa). Após vinte minutos de incubação em ausência de luz, a reação foi interrompida adicionando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1M; 50 μ L/poço). A leitura da placa de ELISA foi realizada em espectrofotômetro com filtro de referência de 492 nm (Spectra Max 250, Molecular Devices, Minneapolis, MN, USA), sendo determinadas as concentrações dos marcadores a partir da curva-padrão por meio do programa Soft Max Pro versão 3.1.1 (Molecular Devices, Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.2.2 Determinação das concentrações plasmáticas de TBARS

A reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA, principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar as concentrações plasmáticas de TBARS, de acordo com o método descrito por descrito por Ohkawa et al. (1979). Alíquotas de soro (0,2 mL) foram adicionadas em 250 μ L de ácido acético (2,5M, pH 3,4) e 250 μ L ácido tiobarbitúrico (0,8%). Esta mistura foi incubada por 90 minutos a 95° C e depois centrifugada a 5.000 xg por 5 minutos (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific, EUA). O sobrenadante da reação foi analisado em duplicata, no leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) à 532nm. A concentração plasmática de TBARS foi estimada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de malondialdeído (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (Sigma, EUA) como padrão externo. A quantidade de malondialdeído

(MDA) produzido foi interpretada como a concentração plasmática de TBARS. Os resultados foram expressos em equivalentes de MDA/mg proteína.

4.2.3 A capacidade antioxidante total

O balanço antioxidante total foi determinado pelo ensaio FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) (BENZIE & STRAIN 1996) que se baseia na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isto ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridils-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado com uma cor azul intensa, o que possibilita ser monitorado por espectrofotometria. Para tais alíquotas de soro de 72 μL , foram adicionados 528 μL de reagente FRAP. Esta mistura foi incubada por 60 minutos em uma estufa a 37°C e depois centrifugada a 300 xg por 5 minutos (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific, EUA). O sobrenadante da reação foi analisado, em duplicata, no leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) à 595nm. A concentração plasmática de FRAP foi estimada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de proteína. O complexo corado pela reação do reagente com o Fe^{2+} produzido foi interpretado como a concentração plasmática de FRAP. Os resultados foram expressos em equivalentes de $\text{mmolFeSO}_4/\text{L}/\text{mg}$ proteína.

4.2.4 Classificação dos cortes histológicos

A articulação tíbio-femoral foi removida utilizando ferramenta rotativa de velocidade variável (Dremel, 300) com disco diamantado, sendo os cortes realizados em torno de 2cm acima e abaixo da linha média do joelho. As peças permaneceram 24 horas em solução de formalina neutra tamponada a 4%. Em seguida, elas foram lavadas com água deionizada e colocadas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% para descalcificação. Quando já em descalcificação adiantada, as peças foram cortadas em duas metades, aproximadamente iguais, seguindo a orientação do plano sagital ou ao longo dos ligamentos cruzado anterior e cruzado posterior do joelho, formando, assim, uma metade látero-lateral e outra látero-medial. Essas metades permaneceram mais uma semana na solução descalcificadora para finalização do processo.

Procedeu-se a sequência do preparo histológico, com a inclusão em parafina das peças. Após serem retiradas da solução de EDTA, as peças foram lavadas com água deionizada e passaram por um processo de desidratação gradual em etanol (2 x 70%, 2 x 80%,

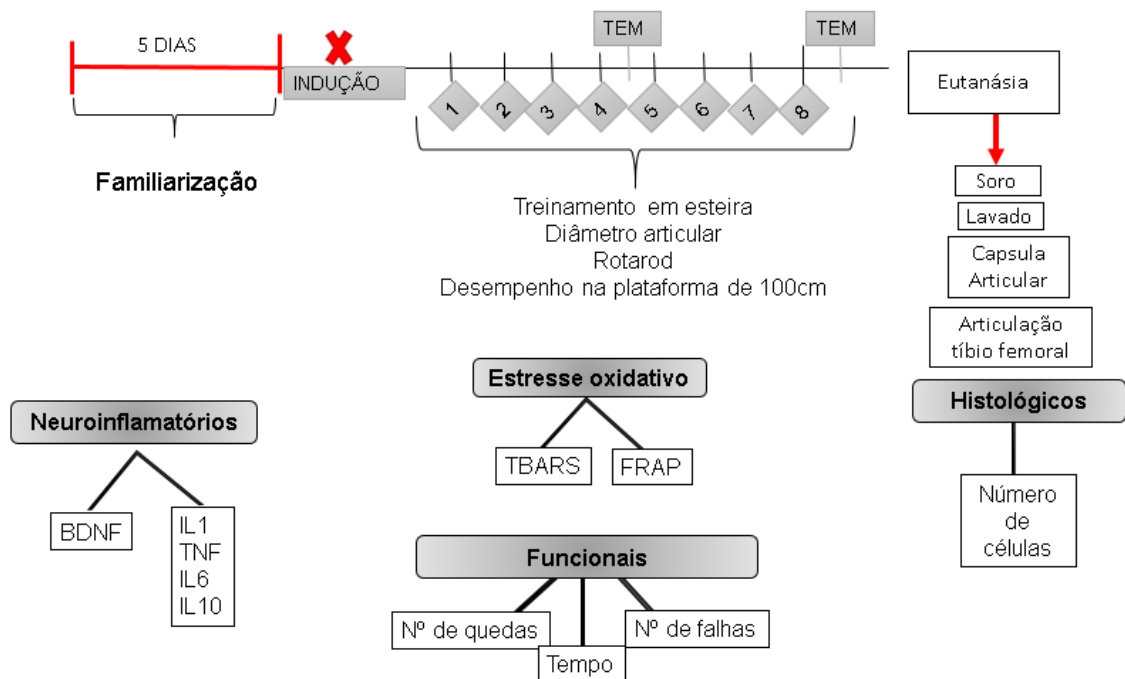
90%, 95%, 3 x 100% - 30 minutos cada banho). Na sequência, elas foram diafanizadas em xilol (3 x 20 minutos), impregnadas em parafina (3 x 40 minutos) e incluídas em parafina com o plano do corte para baixo.

Utilizando o micrótomo, cada bloco de parafina foi cortado no plano sagital gerando três secções de 6 µm de cada metade. Para a análise histopatológica da cartilagem, as lâminas foram coradas com Eosina e Hematoxilina.

4.2.5 Quantificação de células

Para quantificar o número de células digitalizou-se as imagens utilizando a microcâmara (UCMOS SERIES, TP6031000) acoplada ao Microscópio (XJS9000). Os parâmetros para aquisição das imagens a serem analisadas foram o terço medial do côndilo femoral de todos os animais. Foram obtidas três imagens seriadas por animal, digitalizadas por meio da objetiva de 40x. O programa ImageJ foi utilizado para contar células. O número médio de células foi estabelecido em duas contagens em dias diferentes por um pesquisador velado.

Figura 9. Delineamento do estudo



5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

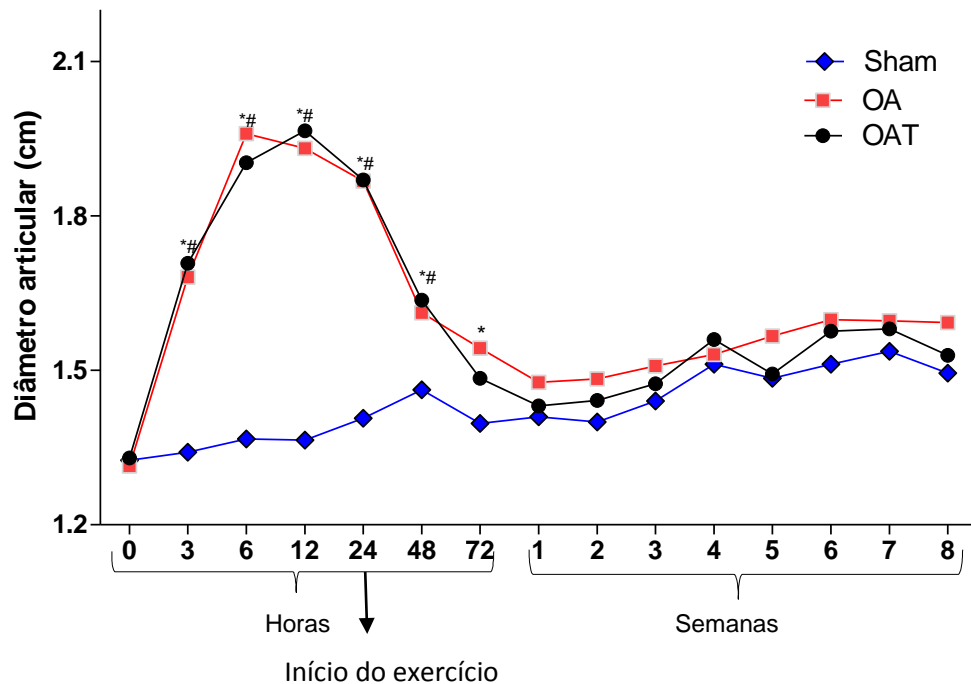
Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. Para verificar a normalidade dos dados utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foram utilizados testes paramétricos para a análise estatística. A análise de variância (ANOVA) *two-way* com medidas repetidas foi utilizada para avaliar o efeito do exercício físico nos parâmetros de edema articular e o peso corporal ao longo das 8 semanas de treinamento. Para analisar efeito do exercício físico sobre a concentração de marcador inflamatório IL6 e o número de condrócitos, que apresentaram distribuição paramétrica, usou-se o ANOVA *one way* seguido pelo post hoc de Tukey. Para os biomarcadores inflamatórios que apresentaram distribuição não paramétrica (IL1, TNF, IL10), foi utilizado o Teste de Kruskal Wallis com post hoc de Dunn. O mesmo ocorreu para as variáveis de desempenho articular (Número de quedas no aparelho RotaRod, Tempo de deslocamento em plataforma de 100cm, número de falhas durante deslocamento em plataforma de 100cm). Para comparar as concentrações de BDNF entre o grupo treinado e não treinado e avaliar o efeito do exercício sobre a expressão da neurotofina foi utilizado o Teste t de Student. Foram realizados testes de correlação de Spearman ou Pearson para verificar a associação entre os biomarcadores estudados (variáveis independentes) e as variáveis de desempenho físico e funcional (variáveis dependentes). Posteriormente, foi realizada análise de regressão simples entre as variáveis dependentes e as variáveis independentes que apresentaram valor $p < 0,20$. Por fim, modelos de regressão linear *stepwise* foram utilizados para verificar a associação entre os biomarcadores selecionados e as variáveis que avaliaram a funcionalidade dos animais.

6. RESULTADOS

Todos os vinte e setes animais recuperaram da anestesia. Nenhum sinal de resposta tecidual adversa macroscópica foi observado durante o período experimental. A figura abaixo (figura 10) representa o diâmetro articular demonstrando que o modelo de indução de OA foi efetivo em causar edema articular em ambos os grupos induzidos, a saber OA e OAT.

Vale mencionar que o edema articular do grupo OAT retornou aos valores comparados ao grupo SHAM 48h após a indução ($p < 0,001$) e o do grupo OA retornou aos valores comprados ao grupo SHAM 72h após a indução ($p < 0,01$).

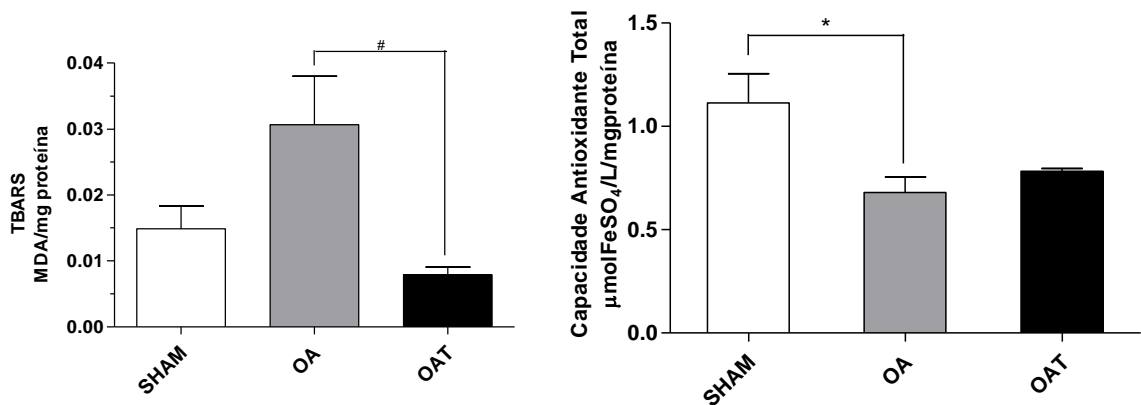
Figura 10. Medidas de diâmetro articular durante 8 semanas.



Dados apresentados em média e erro padrão. SHAM, OA= Osteoartrite, OAT = Osteoartrite Treinado. Diâmetro articular durante o tempo de indução. *Diferença entre o grupo OA vs SHAM. $p < 0,01$. #Diferença entre o grupo OAT vs grupo SHAM $p < 0,001$.

Os resultados demonstraram que a indução de osteoartrite aumentou em média 1,14 vezes a concentração plasmática de TBARS e reduziu em média 6,83% a concentração plasmática de FRAP ($p = 0,02$). O treinamento com exercício físico moderado em ratos com osteoartrite de joelho induzida retornou as concentrações plasmáticas de TBARS a valores próximos aos do grupo SHAM, sem alteração na capacidade antioxidante total, demonstrando sua efetividade em modular marcadores sistêmicos de dano e morte celular. (TBARS: $p = 0,001$; $d = 0,86$ $p = 0,95$; ; $P > 0,05$; $d = 0,62$, $P = 0,78$).

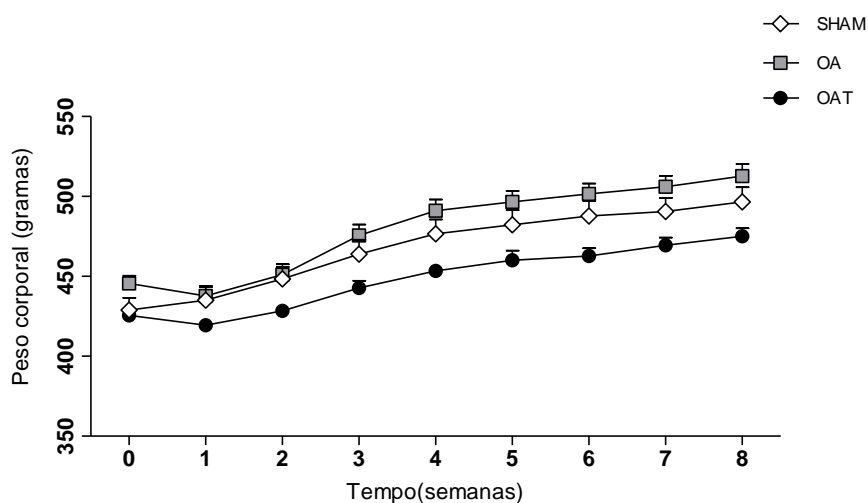
Figura 11. Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.



Dados expressos em média \pm E.P.M OA: Osteoartrite; OAT: Osteoartrite treinado. *Diferença entre OA vs SHAM # Diferença entre OA vs OAT. TBARS ($p=0,001$) e (FRAP $p=0,002$).

Ao final dos experimentos, os ratos estavam com 6 meses de idade, massa corporal média de 495 ± 23 g. Assim, não houve diferença entre os grupos no peso corporal antes e 8 semanas após o período de intervenção ($p>0.05$), demonstrando que a sobrecarga articular inerente ao peso corporal foi similar entre grupos.

Figura 12. Peso corporal dos animais durante o período de treinamento.



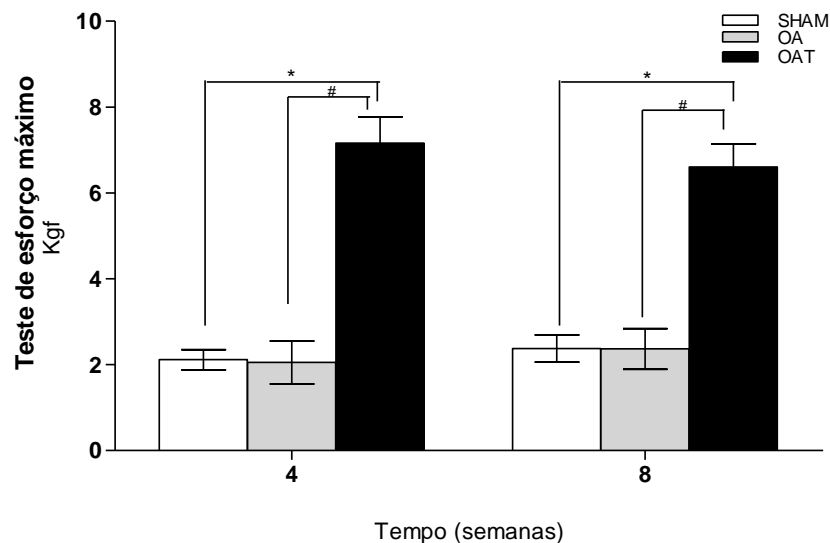
Dados apresentados em média e erro padrão. SHAM, OA= Osteoartrite, OAT = Osteoartrite Treinado.

O desempenho físico, representado pelo trabalho total durante o teste progressivo em esteira, foi avaliado 4 semanas após o início do treinamento e 24 horas após o período de 8 semanas nos 3 grupos.

O grupo com OA (2,37±1,10 kgm) realizou menor trabalho total comparado ao grupo SHAM (2,38±0,80 kgm), demonstrando o impacto da OA de joelho no desempenho físico em teste progressivo até a fadiga em ratos.

O treinamento com exercício físico aumentou a carga total de trabalho no grupo OAT em torno de 64,0% comparado ao grupo AO e 63,9% comparado ao grupo SHAM ($p = 0,001$), evidenciando a efetividade do treino proposto para gerar adaptações e impactar positivamente no desempenho em teste progressivo até a fadiga em ratos com indução de osteoartrite de joelho.

Figura 13- Teste progressivo de esforço máximo em esteira.

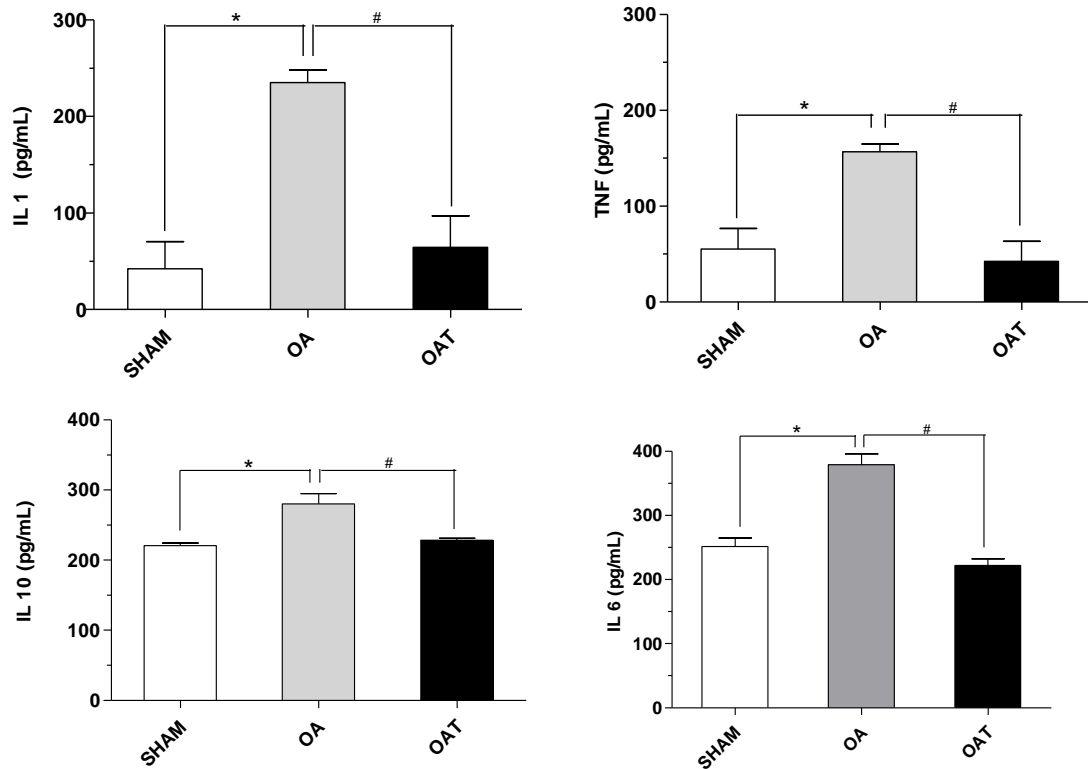


Dados apresentados em média e erro padrão. SHAM, OA= Osteoartrite, OAT = Osteoartrite Treinado.
*Diferença entre OAT vs SHAM. # Diferença entre OAT vs OA.

As concentrações de IL1, TNF, IL10 (lavado articular) e IL6 (macerado de cápsula articular) aumentaram em média 5,55, 2,84, 1,27 e 1,50 vezes, respectivamente. O treinamento com exercício físico moderado na esteira reduziu as concentrações articulares destes biomarcadores inflamatórios nos ratos do grupo OAT a valores próximos aos do grupo

SHAM (IL-1 β : p <0,0001, d = 1,18, P = 1,00 TNF: p <0,0001, d = 1,00, P = 1,00, IL10: p <0,0001, d = 1,32, P = 1,00, IL6: p <0,005, d = 1,68, P = 1,00).

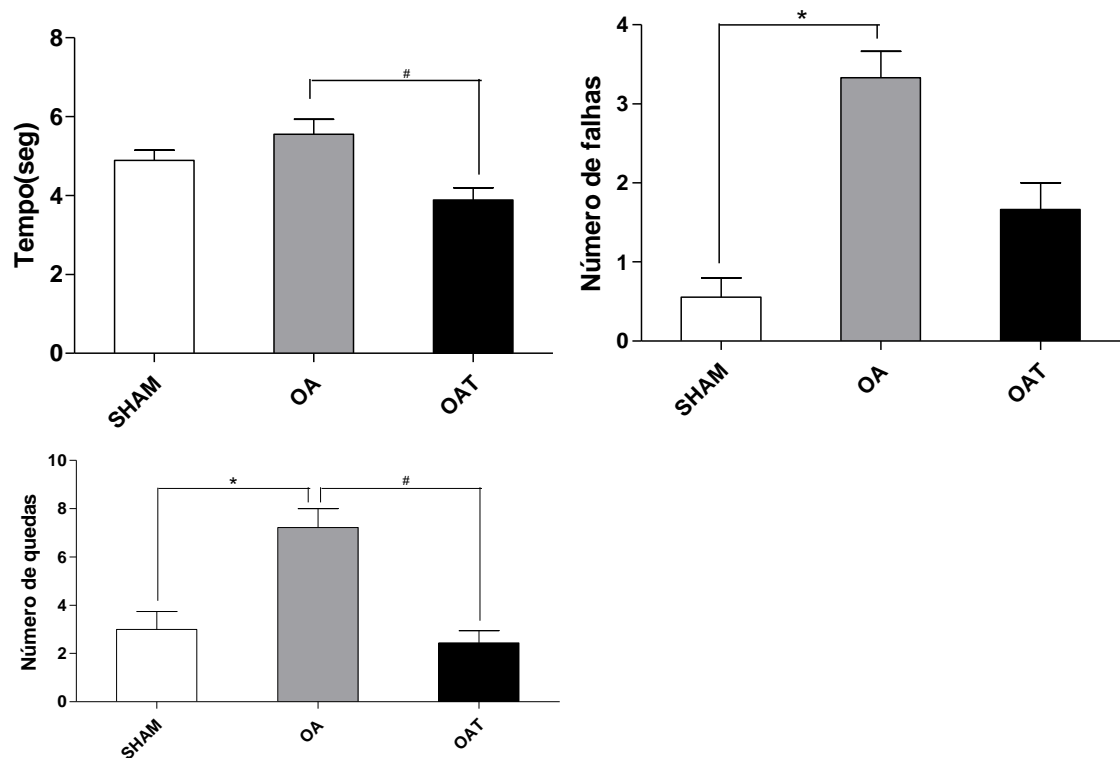
Figura 14. Avaliação das concentrações de citocinas locais.



Dados expressos em média e erro padrão da média. Osteoartrite= OA. Osteoartrite treinado = OAT.
*Diferença entre SHAM vs OA. #Diferença entre OA vs OAT.

A análise dos testes de desempenho funcional mostrou que a indução de osteoartrite de joelho aumentou em média 1,13 vezes o tempo de deslocamento em uma plataforma de 100 cm de comprimento, 6,05 vezes o número de falhas no percurso e 2,40 vezes o número de quedas durante o teste Rotarod. O treinamento físico moderado na esteira causou efeito positivo na doença, uma vez que melhorou o desempenho nos três testes, equiparando aos escores do grupo Sham (Número de quedas: p = 0,002; d = 1,05, P = 1,00; Falha: p = 0,0002 d = 0,26, P = 1,00, Tempo: p = 0,005; d = 0,72, P = 0,89).

Figura 15. Testes de avaliação de desempenho motor e físico funcional de ratos



a) Tempo de deslocamento em plataforma de 100cm # diferença entre OAT vs OA ($p=0,005$). b) Número de falhas no deslocamento em plataforma de 100 cm* diferença entre AO vs Sham ($p= 0,0002$). c) Número de quedas no Rotarod * diferença entre AO vs Sham # diferença entre OA vs SHAM ($p= 0,0002$).

As concentrações no lavado articular de IL1 β foram associadas positivamente com as concentrações articulares de TNF α ($p<0,001$) e IL10 ($p=0,030$), concentrações plasmáticas de TBARS ($p=0,021$), número de quedas no Rotarod ($p=0,00$), número de falhas ao se deslocar em plataforma de 100cm ($p<0,001$). Foi também encontrada associação positiva entre as concentrações articulares de TNF α e concentrações no lavado de IL-10 ($p<0,001$), concentrações plasmáticas de TBARS ($p=0,03$), número de quedas no Rotarod ($p<0,001$), tempo para deslocamento na plataforma de 100cm ($p<0,001$) e número de falhas durante o deslocamento ($p=0,005$). As concentrações no lavado articular de IL-10 foram positivamente associadas com o número de quedas ($p<0,001$) e número de falhas ($p<0,001$). Por fim, as concentrações plasmáticas de TBARS também apresentaram associação positiva com as concentrações plasmáticas de FRAP ($p=0,04$), número de quedas ($p=0,03$) e tempo para deslocamento na plataforma ($p=0,002$). O biomarcador intra-articular IL1 β apresentou correlação significativa com o número de quedas ($r=0,69$; $p<0,0001$) e número de falhas ($r=0,66$; $p<0,0001$). Houve correlação significativa entre o tempo de deslocamento ($r=0,63$;

$p < 0,0001$) e o o número de falhas ($r = 0,52$; $p = 0,005$). Foram testados modelos de regressão linear múltipla linear e observou-se que a IL1 β e o TNF em conjunto explicaram 58% da variabilidade do número de quedas ($p < 0,001$). Além disso, apenas o TNF explicou 29% da variabilidade do tempo de deslocamento ($p = 0,002$) e 21% da variabilidade do número de falhas ($p = 0,01$).

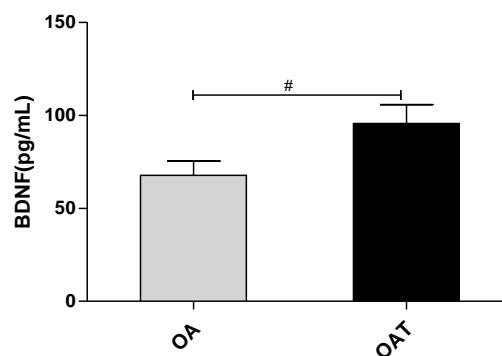
Tabela 2: Análise de regressão linear múltipla *stepwise*.

| Marcadores de lesão articular | Número de queda | | | Tempo de descolamento | | | Número de falhas | | |
|-------------------------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------------|--------------|----------------|------------------|--------------|----------------|
| | B | P | R ² | β | P | R ² | β | p | R ² |
| | | | 0.58 | | | 0.29 | | | 0.21 |
| IL1 β (pg/mL) | 0.40 | 0.01* | | -0.003 | 0.99 | | 0.32 | 0.10 | |
| TNF (pg/mL) | 0.51 | 0.002* | | 0.57 | 0.02* | | 0.49 | 0.02* | |

Legenda: β , coeficiente de regressão padronizado; R², determinação coeficiente ajustado; IL1, Interleucina 1; TNF, Fator de necrose tumoral.

O treinamento com exercício físico de intensidade moderada aumentou a concentração de BDNF na cápsula articular em 41% em relação ao grupo osteoartrite, mostrando o papel modulador do treinamento nesta neurotrofina (Fig. 16).

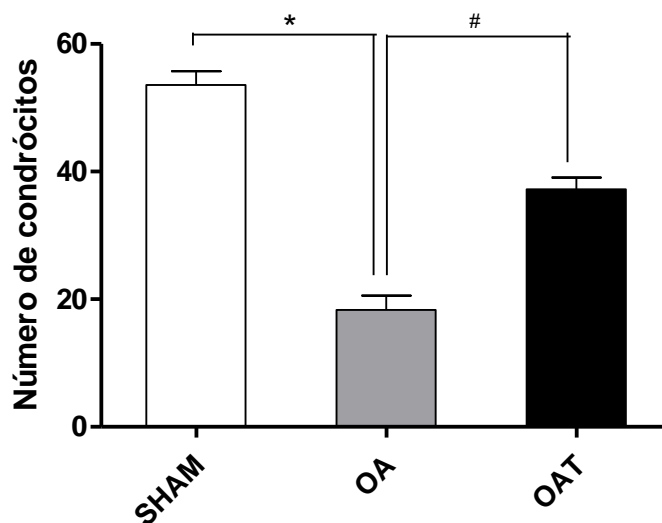
Figura 16. Concentração do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no macerado de cápsula articular.



Dados expressos em média e erro padrão da média. OA = Osteoartrite. OAT= Osteoartrite treinado. # Diferença OA vs OAT. $p = 0,005$.

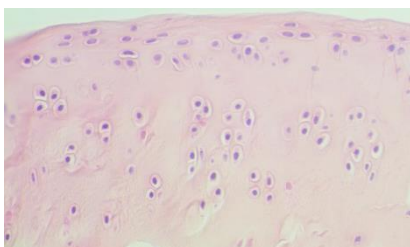
A quantificação de núcleos corados por hematoxilina demonstrou que a indução de OA reduziu em aproximadamente 35% o número de células (condrócitos) vivas comparado ao grupo SHAM. O treinamento físico moderado (grupo OAT) foi capaz de prevenir a morte celular dos condrócitos, uma vez que o número de células ativas no grupo treinado (OAT) foi 51,35% maior que o grupo OA ($p < 0,0001$).

Figura 17. Quantificação das células no terço médio do fêmur.

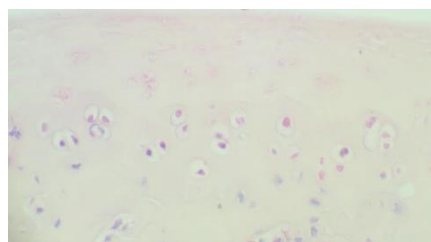


Dados expressos em média \pm E.P.M. OA: Osteoartrite; OAT: Osteoartrite treinado. # Diferença entre OA vs SHAM. *Diferença entre OAT vs SHAM ($p < 0,0001$).

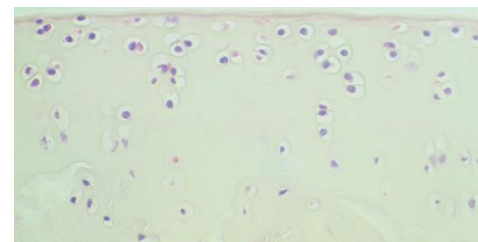
Figura 18. Representação histológica da população de células (condrócitos).



a). Grupo SHAM.



b) Grupo OA.



c) Grupo OAT.

7. DISCUSSÃO

A osteoartrite é uma doença articular progressiva resultante do desequilíbrio das vias anabólicas e catabólicas que controlam a síntese de componentes da matriz extracelular da cartilagem (GOLDRING & GOLDRING 2004; ROSE *et al.*, 2012), induzindo alterações nas propriedades do tecido articular que alteram a constituição da estrutura (BRODY 2015) e impactam negativamente no desempenho físico e funcional. Embora amplamente relatados os benefícios de exercícios que imprimem cargas dinâmicas compressivas na cartilagem, até onde se sabe nenhum estudo relacionou alterações no status oxidativo sistêmico e perfil inflamatório articular com funcionalidade em ratos com osteoartrite induzida do joelho.

Diante disso, o presente estudo foi o primeiro que procurou esclarecer o papel do treinamento com exercício físico moderado na esteira na modulação do estado oxidativo sistêmico e perfil inflamatório local e sua associação com a funcionalidade em modelo animal com osteoartrite induzida do joelho. Em termos gerais, os resultados mostraram associação entre pior funcionalidade; incluindo maior tempo e falhas durante o deslocamento em plataforma de 100 cm, maior número de quedas durante teste padronizado realizado em aparelho com gaiola giratória; e altas concentrações locais de biomarcadores de degradação articular (TNF e IL1) em ratos com osteoartrite de joelho induzida. Assim, o treinamento físico em esteira foi capaz de reverter aspectos inflamatórios articular e oxidativos sistêmicos, impactando positivamente no desempenho das tarefas de marcha, função motora e desempenho físico. Achados histológicos confirmaram a eficácia do treinamento com exercício físico moderado uma vez que a referida intervenção restaurou a integridade da superfície articular preservando, desta forma, a celularidade de condrócitos no modelo estudado.

Evidências sugerem que marcadores biológicos inflamatórios (ATTUR *et al.*, 2013) e parâmetros do estresse oxidativo são fatores agravantes para o desenvolvimento e progressão da osteoartrite (HENROTIN *et al.*, 2003; LOESER 2012). Em pacientes com osteoartrite, os condrócitos, assim como as células sinoviais, produzem concentrações aumentadas de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral alfa (WOJDASIEWICZ *et al.* 2014). Kim e colaboradores (2010) demonstraram que as referidas citocinas inflamatórias são responsáveis pela lesão do DNA mitocondrial na osteoartrite, contribuindo com a formação de espécies reativas de oxigênio e morte de condrócitos (KIM *et al.*, 2010; ALTINDAG *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2012). As forças de compressão, tração e cisalhamento de baixa magnitude exercidas na atividade de impacto, como o treinamento

físico, promovem a regulação fisiológica, modulando, desta forma, a síntese de colágeno e proteoglicanos, que são inibidos nas articulações inflamadas. Isso poderia explicar a maior preservação do teor de proteoglicano na cartilagem articular de ratos submetidos a exercícios de impacto moderado (GALOIS *et al.*, 2003; GALOIS *et al.*, 2004; CIFUENTES *et al.*, 2010). Assim, os autores acreditam que os efeitos benéficos estariam relacionados com redução da apoptose dos condrócitos no grupo experimental treinado, diminuindo os metabólitos da morte celular e a indução da expressão de fatores pró-inflamatórios (GALOIS *et al.*, 2003). Além disso, a alta concentração plasmática de espécies reativas ao oxigênio atuaria mediando a expressão de citocinas, potencializando, desta forma, os efeitos deletérios da inflamação e o processo de degradação, lesão e peroxidação lipídica em condrócitos.

Na osteoartrite, as citocinas inflamatórias presentes na cavidade articular alteram o equilíbrio bioquímico do compartimento articular resultando em apoptose dos condrócitos. A produção e secreção de citocinas pró-catabólicas favorece o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio promovendo estresse oxidativo. A interação dos radicais livres com o DNA dos condrócitos modifica os componentes celulares, como proteoglicanos e colágenos, bem como a oxidação protéica, alterando suas funções biológicas (HENROTIN *et al.*, 2003; YUDOH *et al.*, 2005) a favor da degradação da cartilagem, o que pode comprometer a fluidez do líquido sinovial e síntese de outros componentes. Como resultado da alteração estrutural do tecido, ocorrem danos físicos e funcionais.

Alguns dos principais fatores neste processo são as citocinas pró catabólicas (IL e TNF) e a citocina reguladora (IL6), favorecendo vias de degradação por ativação de outras vias, como as metaloproteases de matriz (MMP). O aumento do estado inflamatório resulta na perda da integridade da matriz extracelular, danos oxidativos e, finalmente, morte de condrócitos, comprometendo a função articular.

Em modelo experimental utilizando cães com osteoartrite induzida, a concentração de MDA aumentou em função do tempo. Este aumento relacionou com a concentração de marcador de degradação do colágeno tipo II (GORANOV 2007). Os resultados sugeriram relação entre o estresse oxidativo e degradação da cartilagem. Além disso, o estresse e os danos oxidativos resultaram em morte celular não programada, causando a liberação de partículas e moléculas oxidadas, bem como a degradação celular, agravando ainda mais o estado inflamatório da articulação (HENROTIN *et al.* 2003; WATARI *et al.* 2011).

Pacientes com osteoartrite de joelho têm concentrações plasmáticas elevadas de espécies reativas de oxigênio e menores quantidades de antioxidantes em relação aos

controles saudáveis (ABRUZZO *et al.*, 2013; GERMANOU *et al.*, 2013). Esses fatos podem resultar em altas concentrações de estresse oxidativo e papel crítico na degradação da cartilagem (SUANTAWEE *et al.*, 2013). Esses achados estão de acordo com o presente estudo. Assim, em ambos os modelos (humano e animal) é evidente que os portadores de osteoartrite de joelho têm altas concentrações de biomarcadores de estresse oxidativo sistêmico que podem comprometer a matriz celular. Assim, a inibição deste processo pode efetivamente prevenir a degradação da cartilagem articular e neoformação do colágeno tipo II (GORANOV, 2007).

A supressão de vias que favorecem o catabolismo tecidual pode estar relacionada à transdução dos sinais mecânicos de compressão dinâmica nos condrócitos. Li e colaboradores (2013) avaliaram o efeito de respostas anabólicas em células de cartilagem bovina, promovendo biossíntese de matriz com diferentes intervalos de compressão (10%, 20% e 30%), e demonstraram o "anti-catabólico" de compressão dinâmica moderada e supressão da expressão de TNF, IL6 e receptores solúveis de TNF (LI *et al.*, 2013). Assim, os efeitos do controle do catabolismo parecem estar relacionados com um intervalo de frequência de compressão, amplitude e carga imposta de intensidade baixa a moderada. Desta forma, é enfatizada a importância de um limiar de amplitude de tensão para a regulação de vias inflamatórias e viabilidade celular Quinn (1998) se propôs a avaliar a síntese, deposição e deformação de matrizes em condrócitos individuais em explantes de cartilagem compactados mecanicamente. Os resultados sugerem que as interações célula-matriz na matriz associada às células podem ser um aspecto particularmente importante da resposta dos condrócitos à compressão mecânica, possivelmente envolvendo limitações de transporte macromolecular e mudanças morfológicas associadas ao fluxo de fluido e compactação local da matriz em torno das células. E maior sensibilidade à compressão mecânica. A compressão estática poderia estimular a deposição direcional de proteoglicanos secretos em torno de condrócitos, sobrepostos a uma inibição da síntese de proteoglicanos, (SOULHAT *et al.*, 1999; ROJAS-ORTEGA *et al.*, 2015). Além disso, a carga de exercício está relacionada à produção e liberação de neurotrofina BDNF (NOFUJI *et al.*, 2008; YARROW *et al.*, 2010), que é um fator de crescimento importante expresso em condrócitos articulares (GRIMSHOLM *et al.*, 2008) e em placas epifisárias de pacientes com osteoartrite. Esta neurotrofina está relacionada ao crescimento e, principalmente, à diferenciação (HUTCHISON, 2012) desse tipo celular, influenciando a via de proliferação atuando, desta forma, como agente reparador. Além disso, também tem sido sistematicamente aumentada em pacientes com osteoartrite de joelho (SIMÃO *et al.* 2014).

Como exercícios de baixa a moderada intensidade parecem desempenhar papel modulador resultando em ação antiinflamatória, escolhemos neste estudo utilizar como intervenção terapêutica o treinamento físico de intensidade moderada realizado na esteira, a fim de promover a bioestimulação mecânica de compressão articular (FELSON, 2014). Vale ressaltar que durante todo o período de treinamento não houve aumento da carga articular, como a inclinação do tapete rolante, mantendo-se constante a porcentagem de compressão articular, garantindo maior controle interno do estudo. Assim, a mecanotransdução ativa promoveu alterações na tensão de oxigênio, resultando em efeitos positivos na síntese da matriz e no crescimento celular (O'HARA *et al.*, 1990). Esses efeitos podem ser explicados pelo deslocamento (transporte) de fatores de crescimento ou citocinas celulares pela alteração do metabolismo celular. Diante do exposto, os resultados mostraram que o treinamento proposto apresentou efeito de controle inflamatório, demonstrado pela redução no nível de biomarcadores pró-inflamatórios, IL1 e TNF, no lavado articular em conjunto com efeito modulador nos biomarcadores articulares IL10 e IL6. Embora se entenda que a inflamação articular contribui com o início e progressão da osteoartrite, poucos estudos abordaram a relação entre as alterações e expressões de citocinas na cavidade articular e os marcadores sistêmicos de inflamação e estresse oxidativo.

Os efeitos benéficos do exercício moderado (QUINN *et al.*, 1998; ROJAS-ORTEGA *et al.*, 2015) com impacto articular podem ser atribuídos à capacidade de supressão de vias de transdução de sinal de mediadores pró-inflamatórios e catabólicos, concomitantemente à estimulação de vias anabólicas. Estudos *in vitro* demonstraram que o estresse mecânico de baixa a moderada intensidade inibiu a inflamação por supressão de IL1 e TNF, bem como da transcrição de vários fatores pró-inflamatórios e mediadores envolvidos na degradação da cartilagem (FEHRENBACHER *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004). Estudo realizado com modelo animal demonstrou efeito positivo do treinamento com exercícios físicos de intensidade moderada na articulação com osteoartrite, enquanto o treinamento com exercícios de alta intensidade teve efeito deletério (ROJAS-ORTEGA *et al.* 2015). Esses achados parecem demonstrar o papel da dose (intensidade, frequência e duração) do treinamento aeróbio no exercício na modulação da resposta dos condrócitos. Nossos achados novamente atendem a essa premissa, uma vez que o protocolo proposto foi eficaz na redução do nível local de IL1 e TNF no grupo treinado, bem como na redução da concentração sistêmica de MDA, melhorando o desempenho da marcha, desempenho físico e funcionalidade. Os achados histológicos de tecido articular confirmaram a eficácia desta terapia.

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam a efetividade do treinamento físico moderado em reduzir a degradação articular de joelho associada à melhora na funcionalidade em ratos com osteoartrite induzida. A maior conservação de condrócitos infere que a dose moderada de treinamento físico atenua o processo degenerativo articular da osteoartrite de joelho.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S.B. & ATTUR, M., 2009. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 3, p.227, 2009.
- ABRUZZO, P.M. et al. Moderate exercise training induces ros-related adaptations to skeletal muscles. **International Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 8, pp.676–687, 2013.
- ALTAY, M.A. et al. Evaluation of prolidase activity and oxidative status in patients with knee osteoarthritis: relationships with radiographic severity and clinical parameters. **Rheumatology International**, v. 35, n. 10, pp.1725–1731, 2015.
- ALTMAN, R. D.. Early management of osteoarthritis. **American Journal of Managed Care**. Suppl Management, n. 16, pp 41-7, 2010.
- ALTINDAG, O. et al. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. **Rheumatology International**, v. 27, n. 4, pp.339–344, 2007.
- ATTUR, M. et al. Low-grade inflammation in symptomatic knee osteoarthritis: Prognostic value of inflammatory plasma lipids and peripheral blood leukocyte biomarkers. **Arthritis and Rheumatology**, v. 67, n. 11, pp.2905–2915, 2015.
- ATTUR, M. et al. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 25, n. 1, pp.136–44, 2013.
- BENDELE, A., MCCOMB, J., GOULD, T., MCABEE, T., SENNELLO, G., CHLIPALA, E. & GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicologic Pathology**, v. 27, 134-42, 1999.
- BENZIE, I. & STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, pp.70–6, 1996.
- BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis Research Society International**, v. 21, n. 1, pp.16-21, 2013.
- BERG, W. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. **Arthritis Research & Therapy**, v.11, p.250, 2009.
- BLANEY DAVIDSON, E.N., VAN CAAM, A.P.M. & VAN DER KRAAN, P.M. Osteoarthritis year in review 2016: biology. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 2, pp.175–180, 2017.
- BRASIL. Ministério de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação. Normativas do CONCEA. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. 2º Edição, 2015.
- BRODY, L.T. Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function. **Physical Therapy in Sport**, v. 16, n. 4, pp.301–316, 2015.
- BULLOUGH, P. G. The role of joint architecture in the etiology of arthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, 12 Suppl A, S2-9, 2004. 52

BURR, D. B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, pp. 20- 30, 2004.

CIFUENTES, D.J. et al. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 8, pp.1088–1095, 2010.

COMBE, R., BRAMWELL, S. & FIELD, M.J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: A model of chronic nociceptive pain in rats? **Neuroscience Letters**, v. 370, n. 23, pp.236–240, 2004.

COOPER, C., DENNISON, E., EDWARDS, M. & LITWIC, A. Epidemiology of osteoarthritis. **Medicographia**, v. 35, pp. 145-151, 2004.

DAVIDSON, R. K., WATERS, J. G., KEVORKIAN, L., DARRAH, C., COOPER, A., DONELL, S. T. & CLARK, I. M. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, 124, 2006.

FEHRENBACHER, A. et al. Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants in vitro. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 1, pp.39–47, 2003.

FELSON, D.T. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. **Radiologic Clinics of North America**, n. 42, pp.1–9, 2004.

FINN, A. et al. Influence of model and matrix on cytokine profile in rat and human. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 53, n. 12, pp.2297–2305, 2014.

FRANSES, R. E., MCWILLIAMS, D. F., MAPP, P. I. & WALSH, D. A. Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. **Osteoarthritis and Cartilage**, 18, pp. 563-71, 2010.

GALOIS, L. et al., Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: A pilot study. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.12, n.10, pp.779–786, 2004.

GALOIS, L. et al. Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats. **Rheumatology**, v. 42, n. 5, pp.692–694, 2003.

GERMANOU, E.I. et al. Oxidative stress and inflammatory responses following an acute bout of isokinetic exercise in obese women with knee osteoarthritis. **Knee**, v. 20, n. 6, pp.581–590, 2013.

GOLDRING, S.R. & GOLDRING, M.B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. **Clinical orthopaedics and related research**, (427), pp.S27–S36, 2004..

GOMES, W.F. et al., 2012. Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise. **Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 5, pp.759–766, 2012. 53

- GORANOV, N. V. Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 2, pp.192–195, 2007.
- GRIMSHOLM, O. et al. Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. **Cells Tissues Organs**, v. 188, n. 3, pp.299–309, 2008.
- GOLDRING, M. B. & MARCU, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3. p. 224, 2009.
- HELMICK, C.G. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 1, pp.15–25, 2008.
- HENROTIN, Y.E., BRUCKNER, P. & PUJOL, J.P.L. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 10, pp.747–755, 2003.
- HOCHBERG, M. C. Osteoarthritis: new approaches. **Medicographia**, v. 35, pp. 139-144, 2013.
- HUI, W. et al. Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 2, pp.1–10, 2014.
- HUTCHISON, M.R. BDNF alters ERK/p38 MAPK activity ratios to promote differentiation in growth plate chondrocytes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 4, pp.1406–16, 2012.
- IJIMA, H. et al., 2015. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 9, pp.1563–1574, 2015.
- JORDAN, J. M., HELMICK, C. G., RENNER, J. B., LUTA, G., DRAGOMIR, A. D., et al. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in 252 African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. **The Journal of Rheumatology**, v. 34, pp.172-80, 2007.
- KASHIWAGI, M., TORTORELLA, M., NAGASE, H. & BREW, K. 2001. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, pp. 12501-4, 2001.
- KATZ DL, JEKEL JF, ELMORE JG. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. 2a Edição ARTMED. 2005.
- KIM, J. et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 3, pp.424–432, 2010.
- LEANDRO, C.G. et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 21, n. 3, pp.751–756, 2007. 54

- LI, Y. et al. Moderate dynamic compression inhibits pro-catabolic response of cartilage to mechanical injury, tumor necrosis factor- α and interleukin-6, but accentuates degradation above a strain threshold. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 12, pp.1933–1941, 2013.
- LI, Z.C. et al. Decreased expression of microRNA-130a correlates with TNF- α in the development of osteoarthritis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 3, pp.2555–2564, 2015.
- LITTLE, B. C. & SMITH, M. M. **Animal Models of Osteoarthritis. Current Rheumatology Reviews**, v.4, n. 3, 2008.
- LITWIC A, EDWARDS MH, DENNISON EM, COOPER C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. **British Medical Bulletin**, v.105, pp.185-199, 2013.
- LOESER, R. F., GOLDRING, S. R., SCANZELLO, C. R. & GOLDRING, M. B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis & Rheumatology**, **64**, pp.1697-707, 2012.
- HASEEB A. & HAQQI M.T. Immunopathogenesis of Osteoarthritis. **Clinical Immunology**, v.146, n. 3, pp. 185–196, 2013.
- LOEUILLE, D., CHARY-VALCKENAERE, I., CHAMPIGNEULLE, J., RAT, A.-C., TOUSSAINT, F., PINZANO-WATRIN, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: Correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, pp. 3492-3501, 2005.
- LORENZ, H. & RICHTER, W. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 40, pp. 135-163, 2006.
- LOSINA E, WALENSKY RP, REICHMANN WM, HOLT HL, GERLOVIN H, SOLOMON DH, et al. Impact of Obesity and Knee Osteoarthritis on Morbidity and Mortality in Older Americans. **Annals of Internal Medicine**, v. 154, n. 4, pp. 217-26, 2011.
- MARCH LM, BAGGA H. Epidemiology of osteoarthritis in Australia. **Medical Journal of Australia**, v. 180, n. 5 pp. 6-10, 2004.
- MARTINEK, V. Anatomy and pathophysiology of articular cartilage. **Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin**, v. 54, pp.166-70, 2003.
- MCCOY, A.M. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. **Veterinary pathology**, 52(5), pp.803–18, 2015.
- MCKENNA, F., BORENSTEIN, D., WENDT, H., WALLEMARK, C., LEFKOWITH, J. B. & GEIS, G. S. 2001. Celecoxib versus diclofenac in the management of osteoarthritis of the knee. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 1 pp.11-18, 2001.
- MICHAUD CM, MCKENN MT, BEGG S, TOMIJIMA N, MAJMUDAR M, BULZACCHELLI MT, et al. The burden of disease and injury in the United States 1996. **Population Health Metrics**, 4:11, 2006. 55

- MICHAEL, J. W. P., SCHLÜTER-BRUST, K. U. & EYSEL, P. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 107, pp. 152-162, 2010.
- MISHRA, R. et al. A comparative analysis of serological parameters and oxidative stress in osteoarthritis and Rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 8, pp.2377–2382, 2012.
- MOILANEN, E. et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-Mediator role of NO in leptin-induced PGE 2, IL-6, and IL-8 Production. **Mediators of Inflammation**, 2009.
- MURPHY, G. & NAGASE, H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 3, pp.128-35, 2008.
- NOFUJI, Y. et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in trained men. **Neuroscience Letters** , v. 437, n. 1, pp.29–32, 2008.
- O'HARA, B.P., URBAN, J.P. & MAROUDAS. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 49, n. 7, pp.536–539, 1990.
- OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, pp.351–358, 1979.
- OGBONNA, A.C., CLARK, A.K. & MALCANGIO, M., 2015. Development of monosodium acetate-induced osteoarthritis and inflammatory pain in ageing mice. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 37, n. 3, p.9792, 2015.
- PARK, S., HUNG, C.T. & ATESHIAN, G.A. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 1, pp.65–73, 2004.
- PASQUALI RONCHETTI, I., GUERRA, D., TAPARELLI, F., BORALDI, F., BERGAMINI, G., MORI, G. et al. Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled 260 clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) in osteoarthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, pp. 158-69, 2001.
- PELLETIER, J.P., MARTEL-PELLETIER, J. & ABRAMSON, S.B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 6, pp.1237–47, 2001.
- PEREIRA D, PELETEIRO B, ARAÚJO J, BRANCO J, SANTOS RA, RAMOS E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 11, pp. 1270-85, 2011.
- PIEL, M.J. et al., 2014. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. **Gene**, v. 537, n. 2, pp.184–188, 2014.
- POOLE, R. et al. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 3, pp.S10–S16., 2010. 56

- QUINN, T.M. et al. Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants. **Journal of Cell Science**, v. 111 (Pt 5, pp.573–83, 1998.
- RADIN, E. L. & ROSE, R. M. 1986. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 213, pp. 34-40, 1986.
- REED, K.N. et al. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cartilage matrix destruction. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 397 n. 1–2, pp.195–201, 2014.
- ROJAS-ORTEGA, M. et al. Exercise modulates the expression of IL-1?? and IL-10 in the articular cartilage of normal and osteoarthritis-induced rats. **Pathology, research and practice**, v. 211, n. 6, pp.435–443, 2015.
- ROMAN-BLAS JA, JIMENEZ SA. NF-kB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: Review. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.14, pp. 839-848, 2006.
- ROMAN-BLAS, J. A. & HERRERO-BEAUMONT, G. Osteoarthritis pathophysiology: similarities and dissimilarities with other rheumatological diseases and the role of subchondral bone. **Medicographia**, v. 35, pp.158-163, 2013.
- ROMAN-BLAS, J. A. et al. Differential effects of the antioxidant n-acetylcysteine on the production of catabolic mediators in IL-1 β -stimulated human osteoarthritic synoviocytes and chondrocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, n. 1–3, pp.125–131, 2009.
- ROSE, J. et al. DNA damage, discoordinated gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 9, pp.1020–1028, 2012..
- SCANZELLO, C. R. & GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, v. 51, pp. 249-257, 2012.
- SCHUELERT, N. & MCDUGALL, J.J. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 465, n. 2, pp.184–188, 2009.
- SIMÃO, A.P. et al. Involvement of BDNF in knee osteoarthritis: The relationship with inflammation and clinical parameters. **Rheumatology International**, v. 34, n. 8, pp.1153–1157, 2014.
- SOHN, D. H., SOKOLOVE, J., SHARPE, O., ERHART, J. C., CHANDRA, P. E., LAHEY, L. J., et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 4 (7), 2012.
- SOKOLOVE, J. & LEPUS, C.M., 2013. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 5, n. 2, pp.77–94, 2013.
- SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D. & SHIRAZI-ADI. A Fibril-Network-Reinforced Biphasic Model of Cartilage in Unconfined Compression. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 121, n. 3, pp.340–347, 1999. 57

SPECTOR, T. D. & MACGREGOR, A. J. 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12 Suppl A, pp. 39-44, 2004.

SUANTAWEE, T. et al. Oxidative stress, vitamin E, and antioxidant capacity in knee Osteoarthritis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 9, pp.1855–1859, 2013.

TRELLE, S., REICHENBACH, S., WANDEL, S., HILDEBRAND, P., TSCHANNEN, B., VILLIGER, P. M. et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *British Medical Journal*, v. 342, pp. 70-86, 2011.

URBAN, J.P.G. The chondrocyte: A cell under pressure. **Rheumatology**, v. 33, n. 10, pp.901–908, 1994.

VALDES, A. M., VAN OENE, M., HART, D. J., SURDULESCU, G. L., LOUGHLIN, J., DOHERTY, M. & SPECTOR, T. D. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, pp. 533-539, 2006.

WALSH, D. A., BONNET, C. S., TURNER, E. L., WILSON, D., SITU, M. & MCWILLIAMS, D. F. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, pp. 743-51, 2007.

WALSH, D. A., MCWILLIAMS, D. F., TURLEY, M. J., DIXON, M. R., FRANSES, R. E., MAPP, P. I. & WILSON, D. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, pp. 1852-61, 2010.

WATARI, T. et al. Evaluation of the effect of oxidative stress on articular cartilage in spontaneously osteoarthritic STR/OrtCrlj mice by measuring the biomarkers for oxidative stress and type II collagen degradation/synthesis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 2, pp.245–250, 2011.

WENHAM, C. Y. J. & CONAGHAN, P. G. The role of synovitis in osteoarthritis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 2, pp. 349-359, 2010.

WOJDASIEWICZ, P., PONIATOWSKI, Ł.A. & SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chronic rheumatic conditions: Osteoarthritis. [Acesso 15 set. 2015]; Disponível em: <<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>>.

YARROW, J.F. et al., 2010. Neuroscience Letters Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). **Neuroscience Letters**, 479(2), pp.161–165.

YUDOH, K. et al. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. **Arthritis research & therapy**, v. 7, n. 2, pp.R380-91, 2005.

Zhang, W., Moskowitz, R. W., Nuki, G., Abramson, S., Altman, R. D., Arden, N., et al, 2008. 58

OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*, **16**, 137-62.

ANEXO B- Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

----- Mensagem encaminhada -----

De: **Comissao de Etica no Uso de Animais** <ceua@ufvjm.edu.br>

Data: 2 de março de 2016 11:57

Assunto: Parecer **CEUA** - Prot 005/2016

Para: lacerda.acr@ufvjm.edu.br

Prezado(a) Professor(a),

Em cordial visita, venho informá-lo(a) que o **parecer** do Projeto nº **005/2016**, intitulado "Efeito do treino aeróbio realizado na esteira (com impacto) e da fototerapia em parâmetros neuro-inflamatórios, de estresse oxidativo, algico, funcionais e histológicos na osteoartrite de joelho induzida por monoiodoacetato de sódio em ratos.", encaminhado por Vossa Senhoria a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFVJM) já está disponível na PRPPG para retirada.

Na oportunidade informo que a proposta supracitada recebeu parecer **aprovado**.

Obs: O parecer está na PRPPG, prédio da Reitoria, e poderá ser retirado com a recepcionista.

Att.

Ana Flávia de Abreu
Secretária da **CEUA**
PRPPG/UFVJM
Fone: [\(038\) 3532-1242](tel:(038)3532-1242)
VOIP: 3532-8141

ANEXO B- ARTIGO PARA SUBMISSÃO



**FEDERAL UNIVERSITY OF THE JEQUITINHONHA
AND MUCURI VALLEYS
MINAS GERAIS
DIAMANTINA – MINAS GERAIS**



Authors: Jeanne B. Martins¹, Vanessa A. Mendonça¹, Grazielle C. Aguiar², Sueli F. Fonseca¹, Jousielle M. Santos¹, Rosalina Tossige-Gomes¹, Dirceu S. Melo¹, Murilo O. Xavier¹, Hércules R. Leite¹, Ana C. R. Camargos¹, Anderson J. Ferreira², Cynthia F. F. Santos¹, Jacques R. Poortmans³, Ana C. R. Lacerda^{1*}

Title: Moderate exercise program modulates joint biomarkers and improves functional adaptations on knee osteoarthritis in rats

Affiliations:

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

²Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

³Université of libre de Bruxelles, Belgium.

***Address for correspondence:**

Ana Cristina R. Lacerda

Faculty of Health and Biological Sciences

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Campus JK – Highway MGT, 367 – Km 583 – N°. 5000 – Alto da Jacuba

Tel.: + 55/38/35321283 / Email: Lacerda.acr@ufvjm.edu.br / lacerdaacr@gmail.com

Abstract

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the effect of moderate treadmill training on joint inflammatory profile and functional performance on induced knee OA in rats.

METHODS: 27 male rats were divided into three groups of nine animals each: sham (SHAM); induced knee OA (OA); OA exercise training (OAT). The knee OA was induced by monosodium iodoacetate. The OAT group trained for 8 weeks. Functional tests including Rota rod test, displacement in footbridge of 100 cm were performed. The right joint lavage was used IL1 β , TNF, IL10 analysis. Articular capsule of the same joint was used for BDNF

and IL6 analysis. The left joint was used for histological analysis. Redox status was evaluated in plasma.

RESULTS: Oxidative stress parameters and joint biomarkers inflammatory profile indicate the induction of knee OA. The OAT group presented a higher functional performance in all joint function tests, reduction of IL1 and TNF joint level, increase of BDNF joint level. The levels of both IL1 and TNF explained 58% of the variability of number of falls, while only TNF explained 29% of the variability of time of displacement and 21% of the variability of number of displacement failures. The histological data confirm the preservation rate of chondrocytes in the joint cartilage.

CONCLUSION: Our results indicate the effectiveness of moderate treadmill training to reduce knee joint degradation associated to improving functionality of induced knee OA in rats. The greater cell conservation infers that this dose favored the attenuation of the degenerative process.

KEYWORDS: Osteoarthritis, Joint Cartilage, Oxidative Stress, Citokine, Physical Exercise.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The assistance of the Brazilian Society of Physiology (SBFis) is gratefully acknowledged. The authors would like to acknowledge the Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde at the Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, for providing equipments and technical support for experiments.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a progressive disease that results in chronic degenerative of the cartilaginous tissue (1). The knee joint (2) and several muscular insertions contribute to the action of compressive forces and tension favor a new approach towards the understanding of degenerative and inflammatory joint processes (3). Evidence points oxidative stress and consequent increase in reactive oxygen species, inflammatory status and apoptosis of chondrocytes as primary causal factor in the pathogenesis of osteoarthritis. Moreover, oxidative stress and the increase of inflammatory status seem to trigger the cascade of events promoting cartilage damage, neuroinflammatory disease progression, and articular disability (4–6).

Several interventions have been used to improve physical and functional performance in patients with knee osteoarthritis. In order to broaden the knowledge about the effect of therapeutic approaches that minimize the side effect of drug therapy, aerobic physical exercise, besides being easily adherent and low cost, has been used as an alternative to minimize the progression of the disease. Current literature evidences the positive impact of a daily moderate exercise dose on knee joint cartilage(7). This effect seems to be related to the action of mechanical signal transduction (8) on joint activities, the preservation of cartilage constituent proteoglycans and its regulation effect on chondrocytes (9). According to Roman-Blas (2006), the mechanical stress of mild magnitude seems to suppress the pathway of IL1 and TNF release, inflammatory mediators involved in joint degradation. Because of the locally reduction of these markers, there would be up regulation of the synthesis of proteoglycans and collagen (9).

Recently our group demonstrated that a moderate exercise training promotes changes in blood level of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) related to functional improvement, as well as a plasma increased level of BDNF in subjects with knee osteoarthritis (10,11). Moreover, neurotrophins, including BDNF, seem to act directly on chondrocytes differentiation once its activate a pathway which promotes the transition from a proliferative program to a differentiation program (Hutchison, 2012). Until is known, there is insufficient evidence on the modulating effect of the moderate treadmill exercise training in local parameters of knee joint degradation and relation with functional performance. The use of animal model has been fundamental to overcome the challenge in studying the form and initial development of OA. In addition, the rat model allows to study events in joint degradation biomarkers and intra-articular structural changes (12). Therefore, it was

hypothesized that moderate physical exercise training may modulate the inflammatory process and favor stress oxidative balance, preventing the progression of the joint degenerative process in rats with knee OA. Thus, the positive modulation in joint biomarkers level could explain the improvement in physical performance through its functionality. For this purpose, we designed this study to clarify the role of treadmill moderate physical exercise training together with the modulation of joint inflammatory profile, oxidative status, and histological parameters. In addition to a possible association with physical performance and functionality in rats induced with knee OA.

Materials and method

Twenty-seven male Wistar rats (12-week-old) were cared according to the Guiding Principles for the Use of Laboratory Animals (15). This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (under the protocol 005/2015). Food (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) and water were available ad libitum. The room was kept at controlled for humidity (60%) and temperature (22°C). The rats were randomly divided into three groups with nine animals per group: sham group (SHAM), induced knee OA group (OA) and OA exercise training group (OAT).

Osteoarthritis Exposure

The animals were anesthetized with ketamine (80 mg /kg, i.p.) and Xylazine (15 mg /kg, i.p.) while osteoarthritis was induced on right knee joint at 90° flexion by direct infiltration a 29G X 1/2 (BD Ultra-Fine™) insulin needle (1.2 mg of iodoacetate diluted in 50 µL saline solution)(13). The animals of SHAM group was submitted a infiltration containing only 50 µL saline solution.

Moderate aerobic exercise training

A motorized treadmill (Insight®, SP, Ribeirão Preto, Brazil) with six individual lanes and no inclination was used to implement the moderate physical exercise training (13). One week before the start of training, all rats were familiarized to the exercise procedures (10 min/day). The trained group was submitted to an 8-week training program on a treadmill (1% incline) for 3 days/week. The speed of the treadmill was 16 m.min⁻¹ corresponding to approximately 60-70% VO₂max (13). The training started with 30 min/day and there was an increase of 20

min/day thereafter the fourth week, totaling 50 min/day (14). The SHAM and OA groups were placed on the treadmill, which was not turned on, during the same 8 weeks as the OAT group. Physical performance and total workload during a treadmill incremental test (initial speed 10m.min⁻¹, with increase of 3 m.min⁻¹ each 2 minutes) of the 3 groups after eight weeks of starting training.

Assessment of motor activity

Joint function, including motor control of the animals, was evaluated using the Rota rod test (14). For this, the animal was positioned on a rotating rod at a constant speed of 8 revolutions per minute (rpm). The number of falls during the 3-minute period was quantified.

Locomotion test on footbridge

To evaluate the functional performance when moving in a short distance, the animals were placed on a footbridge with a length of 100 cm for locomotion. The animal shifted from end to end and the total time of displacement and the number of times the animal stepped out of the space delimited by 3 mm thick aluminum fillets were quantified. The test was performed by a single pass recorded by video and timer. The time was recorded and the images analyzed later by a blinded investigator to quantify the number of failures.

Eight weeks after the surgical procedures inducing knee OA or sham, all animals were euthanized individually by decapitation and right knee joints of each animal was removed for analyses. EDTA blood collections were centrifuged and serum aliquots stored at -80 °C.

Joint Lavage (JL)

The JL supernatants were stored at -80 °C for later analysis. Immediately after recovering JL, the intra-articular capsule was removed and stored immediately in freezer -80°. The sample was homogenized in phosphate buffer and frozen at -80 °C for further analyses. Joint biomarkers IL1 β , TNF, IL10 were analyzed by ELISA kits according to the manufacturer's instructions (DuoSet, R & D Systems, USA).

Macerated joint capsule

To prepare the capsule macerate, 750 μ L of cytokine extraction solution was used in a beaker together with a tissue homogenizer (Tecnal, TE-103). The capsule was processed at 8 rpm speed for 2 minutes. The volume obtained was centrifuged at 3,500 xg for 10 minutes at 4 °C and stored in a freezer for analysis of the BDNF and IL6 level by ELISA kits according to the manufacturer's instructions.

Measurements of redox status

Reaction time of the thiobarbituric acid with malondialdehyde (MDA) was used to determine lipid peroxidation by TBARS plasmatic level (15). The total antioxidant capacity (FRAP) was determined based on the reduction of ferric-tripyridyltriazine [Fe(III)-TPTZ] complex to ferrous-tripyridyltriazine [Fe(II)-TPTZ](16). Protein level of samples was determined by the Bradford method (17) using bovine serum albumin (BSA) (1 mg/mL) as standard.

Histology

The soft parts and patella of the left joint of each animal were dissected, 4% neutral-buffered formalin for 24h, placed in 10% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.4, for decalcification. Sagittal sections were prepared from tibiofemoral joints. Tissue blocks were placed in formalin, dehydrated in a graded series of ethanol and xylol, embedded in paraffin, cut into 6 μ m serial sections, and stained with hematoxylin e eosin.

Quantification of chondrocytes

The middle third of the joint was used to evaluate the number of active cells considering for counting cells the nucleus stained by hematoxylin present superficial, intermediate, transitional area. The analysis was performed on the articular face of the right femur of the animals. The image was captured by a microscope (model) with a 40X magnification. The ImageJ program was used for counting cells. Two micrographs were done in series and two counts on different days by a blinded investigator were performed. The mean number of cells was established and used for statistical analysis.

Statistical analyses

The data were analyzed using the SPSS statistical package, version 22.0 (Inc., USA) and Graph Pad Prism, version 5.0 (Inc., USA). The Shapiro-Wilk test was applied to evaluate the normality of results. Means \pm S.E.M were calculated, and multiple comparisons were performed by using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc tests (parametric data) or Kruskal Wallis test with Dunn post-hoc (nonparametric data). Size effect (d) and statistical power (P) were checked. The Spearman correlation was employed to verify the association between two intra-articular biomarkers of joint damage (IL1 β , TNF - independent variables) and three functionality measurements: number of falls, time of displacement and number of failures (dependent variables). Confirmatory analyses of the association between selected biomarkers and functionality measurements were performed in three multiple linear stepwise regression models. Bonferroni adjustment was adopted at $\alpha = 0.025$ for statistical significance for multiple models. The graphs presented were made in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

27 animals were available for this study. All of them recovered uneventfully from surgery and exercise training procedure. No signs of macroscopic adverse tissue responses were observed during the experimental period. By the end, the rats were about six months old with a mean weigh 495 ± 23 g. There was no difference in body weight of the animals after the experimental period ($p > 0.05$). The effectiveness of the exercise training was demonstrated by total workload during the progressive treadmill test performed after 8 weeks in the three studied groups. Thus, exercise training increased the total workload of the OAT group (6.88 ± 0.28 kgm) by 63.9% as compared to sham group (2.25 ± 0.13 kgm), and 64.0% as compared to OA group (2.21 ± 0.16 kgm) ($p < 0.001$).

The level of IL1 β , TNF, IL10 in the washed articular and IL6 in the joint capsule OA increased respectively on average 5.55, 2.84, 1.27, and 1.50 fold. Moderate treadmill physical exercise training reduced the level of these inflammatory biomarkers in rats with OA at values close to those of the SHAM group (IL-1 β : $p < 0.0001$, $d = 1.18$, $P = 1.00$; TNF: $p < 0.0001$, $d = 1.00$, $P = 1.00$; IL10: $p < 0.0001$, $d = 1.32$, $P = 1.00$; IL6: $p < 0.005$, $d = 1.68$, $P = 1.00$) (Fig.1).

Physical exercise training plus OA increased the BDNF level in the joint capsule by 41% compared to the OAT group, showing the role of training in the modulation of this neurotrophin ($p = 0.05$; $d = 0.86$, $P = 0.97$). The induction of OA increased on average by 1.14 times the TBARS plasma level and reduced by a mean 6.83% the FRAP plasma level ($p = 0.02$). Moderate treadmill exercise training in induced knee OA rats returned the plasma level

of TBARS to values close to those of the SHAM group, without change in total antioxidant capacity (TBARS: $p = 0.001$; $d=0,86$, $P= 0.95$; FRAP: $p > 0.05$, $d=0.62$, $P=0.78$) (Fig.3).

The analysis of the functional performance tests showed an increase of 1.13 times the displacement time in a 100cm long footbridge and 6.05 times of the number of failures in the course, and a 2.40 times increase of the number of falls during the Rotarod test in the group with induced knee OA compared to SHAM group. The treadmill moderate physical exercise training caused a positive effect on the disease, since it improved the performance in the three tests, matching the SHAM score (Number of falls: $p = 0.002$; $d=1.05$, $P=1.00$; Number of fault: $p = 0.0002$ $d=0.26$, $P=1.00$; Time: $p = 0.005$; $d=0.72$, $P=0.89$). (Fig.4).

The joint biomarker IL1 β presented significant correlation with the number of falls ($r=0.69$; $p<0.0001$) and the number of failures ($r=0.66$; $p<0.0001$). The joint biomarker TNF presented a significant correlation with the three functionality measures: number of falls ($r=0.73$; $p<0.001$), time of displacement ($r=0.63$; $p<0.0001$) and number of failures ($r=0.52$; $p=0.005$). Multiple linear stepwise regression models demonstrated that IL1 β and TNF could explained the 58% variability of the number of falls ($p<0.001$). TNF only explained 29% of the variability of time of displacement ($p=0.002$) and 21% of the variability of number of failures ($p=0.01$). Accordingly, the increase of 1 pg/mL in joint IL1 β level lead to an increase of 0.40 points in number of falls. Eventually, the increase of 1 pg/mL in the joint TNF level leads to an increase of 0.51 points in number of falls, 0.57 seconds in the time of displacement and 0.49 points in the number of failures (Table 1).

Quantification of hematoxylin-stained nuclei demonstrated that the induction of OA reduced the number of cells around 35% compared to the SHAM group. The moderate physical training was able to prevent chondrocytes apoptosis, since the number of active cells in the trained group (OAT) was 51.35% greater than the OA group ($p < 0.0001$) (Figure 4).

Discussion

Current literature evidences that moderate daily dose of exercise may have positive effects on cartilage matrix composition in healthy animals (7). However, as far as we know, this is the first study which investigated the effect of moderate treadmill exercise training in the modulation of joint degradation markers associated with joint function performance in a rat model of induced knee OA. The histological data confirm the preservation rate of chondrocytes in the joint cartilage. In general terms, the results showed an association between worse functionality

represented by increased time of displacement and failures in a footbridge of 100 cm, greater number of falls in Rotarod test associated with high joint degradation biomarkers levels (TNF and IL1 β) in induced knee OA rats. Actually, moderate treadmill training could reverse joint inflammatory profile and decrease systemic MDA level with positive impact in gait tasks performance, joint motor function and physical performance.

Evidences suggest inflammatory biomarkers (6) and parameters of oxidative stress as aggravating factors for the development and progression of OA (4,5). In patients with OA, chondrocytes, as well as synovial cells, produce increased level of inflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL1 β) and tumor necrosis factor (TNF) (18). Kim and colleagues (2010) demonstrated that IL1 β and TNF inflammatory cytokines are responsible for mitochondrial DNA damage in OA, contributing to the occurrence of reactive oxygen species (ROS) and chondrocyte death (19,20). The compression forces, pull and shear of low magnitude exerted in mild impact activity such as moderate treadmill training promote physiological regulation, modulating the synthesis of collagen and proteoglycans, which are inhibited in inflamed joints (21). This could explain the greater preservation of proteoglycan content in the joint cartilage of rats subjected to moderate impact exercise training (22–24). Thus, the authors believe that the beneficial effects would be related to the reduction of chondrocyte apoptosis in the experimental group, reducing metabolites of cell death and induction of the expression of proinflammatory factors (22). In addition, the high level of reactive oxygen species (ROS) would act on the expression of cytokines, potentiating the deleterious effects of inflammation, and may initiate the process of cartilage degradation and the progression of the lesion as a function of the occurrence of lipid peroxidation in chondrocytes.

In OA, proinflammatory cytokines present in the joint cavity alter the biochemical balance of the joint compartment resulting from the chondrocyte apoptosis. The production and secretion of procatabolic cytokines favors the increase of ROS production causing an increase in oxidative stress. The interaction of free radicals with chondrocyte DNA acts directly by modifying cellular components, such as proteoglycans and collagens, as well as protein oxidation, altering their biological functions in favor of cartilage degradation, which may compromise the fluidity of synovial fluid, and synthesis of other components (4,25). Because of the structural alteration of the tissue, physical and functional damages occur.

Some of the main factors in this process are pro-catabolic cytokines (IL1 β and TNF), and the regulatory cytokine (IL6), favoring pathways of degradation by activation other pathways such as matrix metalloproteases (MMP) (26). The increased inflammatory status results in the loss of

extracellular matrix integrity, increasing oxidative damage, and, finally, death of the chondrocytes compromising joint function.

In an experimental model with induced OA on dogs, the level of MDA increased throughout the experiment. This increase was related to the level of collagen type II degradation marker (27). These results suggest a relationship between oxidative stress and cartilage degradation. Stress and oxidative damage can result in cell death, causing the release of particles and oxidized molecules, as well as cellular degradation, further aggravating the inflammatory state of the joint (4,28).

Patients with knee OA have higher plasma level of ROS and lower antioxidant stores as compared to healthy human controls (29). High level of oxidative stress can play a critical role in the degradation of cartilage (30). These findings are in line with our present study. Thus, in both human and animal, it is evident that knee OA carriers have high level of systemic oxidative stress biomarkers that may compromise the cell matrix. Inhibition of this process can effectively prevent degradation of articular cartilage and neo-formation of type II collagen (27).

Suppression of pathways that favor tissue catabolism may be related to the transduction of the mechanical signals of dynamic compression on the chondrocytes. Li and colleagues (2013) evaluated the effect of anabolic responses on bovine cartilage *in vitro* cells culture promoting matrix biosynthesis with different compression ranges (10%, 20% and 30%) and demonstrated the "anti-catabolic" effect of moderate dynamic compression, as well as the suppression of the expression of TNF, IL6 and soluble receptors of IL6 (31). The effects of catabolism control appear to be related to a range of compression frequency, amplitude, and to the imposed load of low to moderate intensity. Thus, the importance of a voltage amplitude threshold for the regulation of inflammatory pathways and cell viability is been emphasized (32–34). In addition, exercise dose seems to relate to the production and release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) (35,36), that is an important growth factor expressed in joint chondrocytes (37) and in epiphyseal plaques of patients with osteoarthritis. It is related to the growth and, mainly, differentiation (38) of this cellular type, influencing the proliferation pathways and can act as a repair agent. In addition, our previous study has demonstrated the involvement of BDNF in knee osteoarthritis and its relationship with inflammation and clinical parameters in human (10).

Since moderate-intensity exercises seem to play a modulatory role resulting in anti-inflammatory action, we chose in this study to use the treadmill moderate intensity physical exercise training in order to promote mechanical biostimulation of joint compression (1). It is worth noting that during the whole period of training there was no increase in joint load, such as inclination of the treadmill, in order to guarantee greater internal control of the study by maintaining a constant

percentage of joint compression. Thus, active mechanotransduction promotes changes in oxygen tension resulting in positive effects on matrix synthesis and cell growth (39). These effects can be explained by the displacement (transport) of growth factors or cellular cytokines by altering the cellular metabolism.

In view of the above, our results showed that the training as proposed presented an inflammatory control effect, demonstrated by the reduction in the catabolic biomarkers joint level (IL1 β and TNF) with a modulating effect on the joint biomarkers level (IL10 and IL6).

The beneficial effects of moderate treadmill training seem to be attributed to the ability of the suppression of signal transduction pathways of inflammatory and catabolic mediators concomitant with the stimulation of anabolic pathways (32,34). *In vitro* studies have demonstrated that mechanical stress of mild to moderate magnitude inhibits inflammation by suppression of IL1 β , TNF and the transcription of various inflammatory factors and mediators involved in joint degradation (40,41). A previous study carried out with rats showed a positive effect of moderate intensity physical exercise training on joint osteoarthritis, whereas high intensity physical exercise training had a deleterious effect (34). These findings seem to demonstrate the role of appropriate dose (intensity, frequency, and duration) of aerobic exercise training in modulating chondrocyte response. Our findings once again meet this premise since the proposed protocol was effective in reducing the joint level of IL1 β and TNF in the trained group, as well as reducing the systemic level of MDA, thus improving the gait performance, physical performance and functionality.

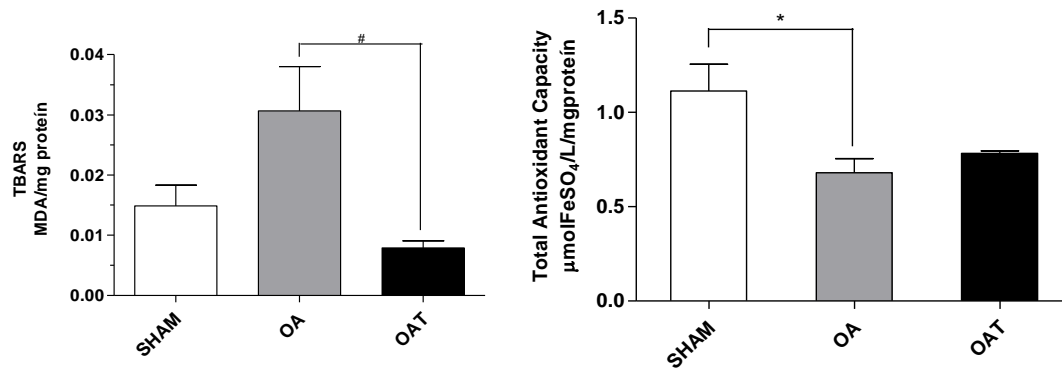
To conclude, a low-impact moderate physical training program seems to modulate chondrocytes via anabolic pathways, resulting in an inflammatory control by reducing articular IL1 β and TNF level, decreasing systemic MDA level, promoting positive regulation in joint neurotrophins (BDNF), thus resulting in a better performance in gait tasks, as well as physical and motor function. Histological parameters infer that this dose favors the attenuation of the degenerative process.

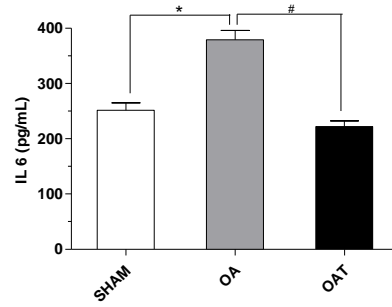
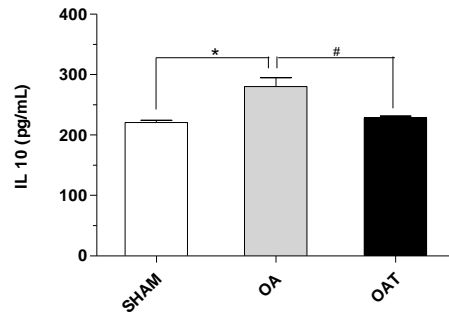
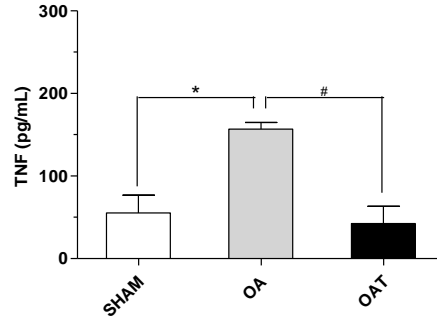
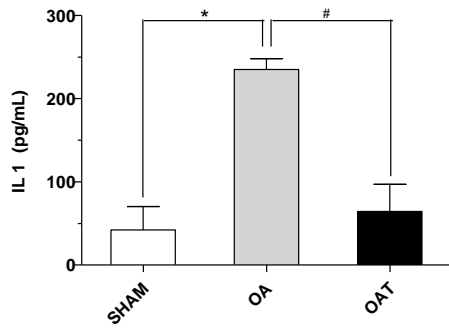
Fig.1. Mean \pm S.E.M of status redox biomarkers measured in plasma. SHAM, OA: Osteoarthritis; OAT: Osteoarthritis plus exercise training. N = 9 per group. (# Difference between OA vs OAT. *Difference between OA vs SHAM).

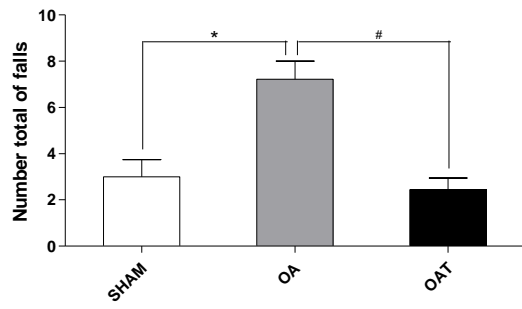
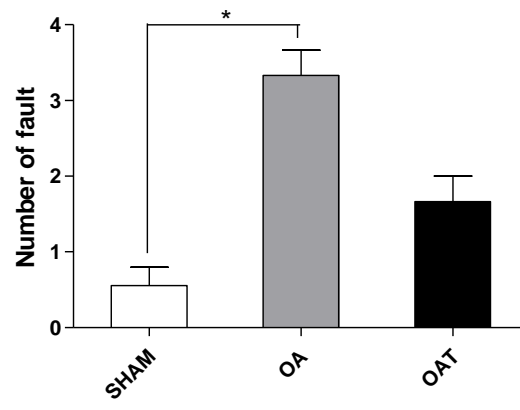
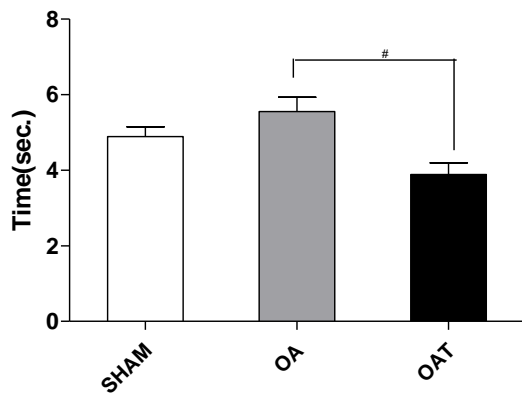
Fig.2. Mean \pm S.E.M of inflammatory biomarkers measured in washed articular (IL1, TNF, IL10) or joint capsule (IL6) in SHAM, OA: Osteoarthritis; OAT: Osteoarthritis plus exercise training. N = 9 per group. # Difference between OA vs OAT. * Difference between OA vs SHAM.

Fig.3. Mean \pm S.E.M of functional performance tests in SHAM, OA: Osteoarthritis; OAT: Osteoarthritis plus exercise training groups. N = 9 per group (# Difference between OA vs OAT; *Difference between OA vs SHAM).

Fig. 4. Mean \pm S.E.M of number of chondrocytes in SHAM, OA: Osteoarthritis; OAT: Osteoarthritis plus exercise training groups. N = 9 per group (# Difference between OA vs OAT, *Difference between OA vs SHAM). Representation of the histological cell number. A). SHAM. B). OA. C). OAT.

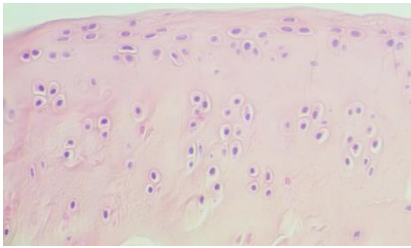
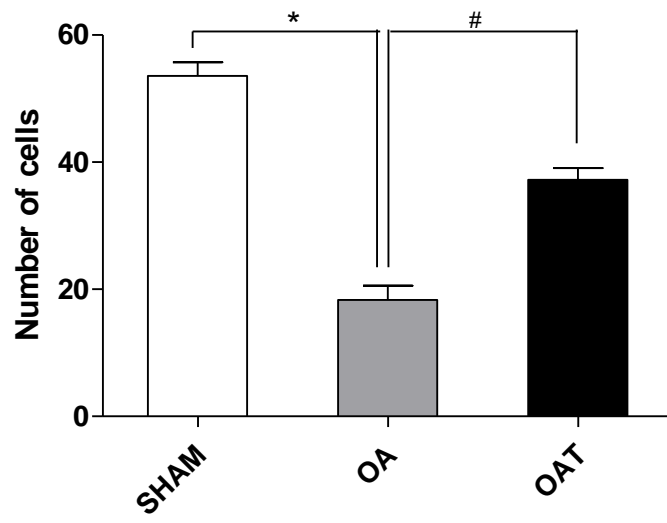




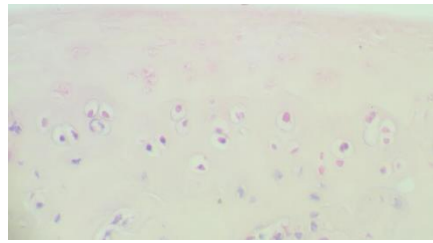


Tab.1. Multiple linear stepwise regression analysis. Legend: β , standardized regression coefficient; R^2 , adjusted determination coefficient; IL1 β , Interleukin 1 beta; TNF, tumor necrosis factor.

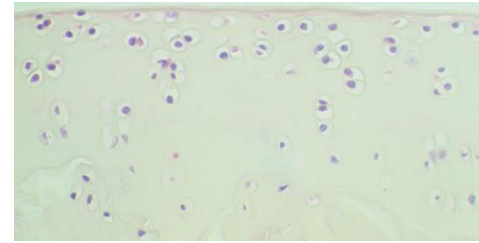
| Joint damage biomarkers | Number of falls | | | Time displacement | | | Number of failures | | |
|----------------------------|-----------------|---------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|--------------------|--------------|-------------|
| | β | P | R^2 | β | P | R^2 | β | p | R^2 |
| | | | 0.58 | | | 0.29 | | | 0.21 |
| IL1 β (pg/mL) | 0.40 | 0.01* | | -0.003 | 0.99 | | 0.32 | 0.10 | |
| TNF (pg/mL) | 0.51 | 0.002* | | 0.57 | 0.02* | | 0.49 | 0.02* | |



a). Grupo SHAM.



b) Grupo OA.



c) Grupo OAT.

REFERENCES

1. Man1. Manuscript A. NIH Public Access. 2014;146(3):185–96.
2. Heijink A, Vanhees M, van den Ende K, van den Bekerom MP, van Riet RP, Van Dijk CN, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the elbow. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2016;24(7):2313–8.
3. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr Cartil.* 2013;21(1):16–21.
4. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JPL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11(10):747–55.
5. Loeser RF. NIH Public Access. 2012;23(5):492–6.
6. Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson SB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol [Internet].* 2013;25(1):136–44.
7. Bricca A, Juhl CB, Grodzinsky AJ, Roos EM. Impact of a daily exercise dose on knee joint cartilage – a systematic review and meta-analysis of Randomized Controlled Trials in healthy animals. *Osteoarthr Cartil [Internet].* 2017;
8. Urban JPG. The chondrocyte: A cell under pressure. *Rheumatology.* 1994;33(10):901–8.
9. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Yamaguchi S, Nagai M, Tajino J, et al. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil [Internet].* 2015;23(9):1563–74.
10. Gomes WF, Lacerda ACR, Mendonça VA, Arrieiro AN, Fonseca SF, Amorim MR, et al. Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise. *Clin Rheumatol.* 2012;31(5):759–66.
11. Simão AP, Mendonça VA, De Oliveira Almeida TM, Santos SA, Gomes WF, Coimbra CC, et al. Involvement of BDNF in knee osteoarthritis: The relationship with inflammation and clinical parameters. *Rheumatol Int.* 2014;34(8):1153–7.
12. McCoy AM. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol [Internet].* 2015;52(5):803–18.

13. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol.* 2003;31(6):619–24.
14. Piel MJ, Kroin JS, Van Wijnen AJ, Kc R, Im HJ. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. *Gene.* 2014;537(2):184–8.
15. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351–8.
16. Benzie I., Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70–6.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
18. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014.
19. Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall IV AW, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthr Cartil [Internet].* 2010;18(3):424–32.
20. Altindag O, Erel O, Aksoy N, Selek S, Celik H, Karaoglanoglu M. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2007;27(4):339–44.
21. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays.* 1995;17(12):1039–48.
22. Galois L, Etienne S, Grossin L, Cournil C, Pinzano A, Netter P, et al. Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats (multiple letters) [1]. *Rheumatology.* 2003;42(5):692–4.
23. Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Loeuille D, et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: A pilot study. *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(10):779–86.

24. Cifuentes DJ, Rocha LG, Silva LA, Brito AC, Rueff-Barroso CR, Porto LC, et al. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2010;18(8):1088–95.
25. Yudoh K, Nguyen van T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2005;7(2):R380-91.
26. Moilanen E, Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Pivrinta U, et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-Mediator role of NO in leptin-induced PGE 2, IL-6, and IL-8 Production. *Mediators Inflamm*. 2009;2009.
27. Goranov N V. Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. *Vet Clin Pathol*. 2007;36(2):192–5.
28. Watari T, Naito K, Sakamoto K, Kurosawa H, Nagaoka I, Kaneko K. Evaluation of the effect of oxidative stress on articular cartilage in spontaneously osteoarthritic STR/OrtCrlj mice by measuring the biomarkers for oxidative stress and type II collagen degradation/synthesis. *Exp Ther Med*. 2011;2(2):245–50.
29. Abruzzo PM, Esposito F, Marchionni C, Di Tullio S, Belia S, Fulle S, et al. Moderate exercise training induces ros-related adaptations to skeletal muscles. *Int J Sports Med*. 2013;34(8):676–87.
30. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Anomasiri W, et al. Oxidative stress, vitamin E, and antioxidant capacity in knee Osteoarthritis. *J Clin Diagnostic Res*. 2013;7(9):1855–9.
31. Li Y, Frank EH, Wang Y, Chubinskaya S, Huang HH, Grodzinsky AJ. Moderate dynamic compression inhibits pro-catabolic response of cartilage to mechanical injury, tumor necrosis factor- α and interleukin-6, but accentuates degradation above a strain threshold. *Osteoarthr Cartil*. 2013;21(12):1933–41.
32. Quinn TM, Grodzinsky AJ, Buschmann MD, Kim YJ, Hunziker EB. Mechanical

- compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants. *J Cell Sci* [Internet]. 1998;111 (Pt 5:573–83. A
33. Soulhat J, Buschmann MD, Shirazi-Adl a. A Fibril-Network-Reinforced Biphasic Model of Cartilage in Unconfined Compression. *J Biomech Eng* [Internet]. 1999;121(3):340–7. Available from: <http://link.aip.org/link/?JBYS/121/340/1>
 34. Rojas-Ortega M, Cruz R, Vega-L??pez MA ntonio, Cabrera-Gonz??lez M, Hern??ndez-Hern??ndez JM, Lavallo-Montalvo C, et al. Exercise modulates the expression of IL-1?? and IL-10 in the articular cartilage of normal and osteoarthritis-induced rats. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2015;211(6):435–43.
 35. Nofuji Y, Suwa M, Moriyama Y, Nakano H, Ichimiya A, Nishichi R, et al. *Neuroscience Letters* Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in trained men. 2008;437:29–32.
 36. Yarrow JF, White LJ, Mccoy SC, Borst SE. *Neuroscience Letters* Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF) &. *Neurosci Lett* [Internet]. 2010;479(2):161–5.
 37. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Forsgren S. Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(3):299–309.
 38. Hutchison MR. BDNF alters ERK/p38 MAPK activity ratios to promote differentiation in growth plate chondrocytes. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2012;26(February):1406–16.
 39. O’Hara BP, Urban JP, Maroudas a. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1990;49(7):536–9.
 40. Fehrenbacher A, Steck E, Rickert M, Roth W, Richter W. Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 2003;410(1):39–47.
 41. Park S, Hung CT, Ateshian GA. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. *Osteoarthr Cartil*. 2004;12(1):65–73.