**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

**ADRIANO PRADO SIMÃO**

# EFEITOS DA ADIÇÃO DA VIBRAÇÃO DE TODO O CORPO AO EXERCÍCIO EM CADEIA CINÉTICA FECHADA (AGACHAMENTO) SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NEUROENDÓCRINOS E A SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESEMPENHO E A CAPACIDADE FUNCIONAL EM IDOSOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO.

**DIAMANTINA - MG**
**2013**

**ADRIANO PRADO SIMÃO**

# EFEITOS DA ADIÇÃO DA VIBRAÇÃO DE TODO O CORPO AO EXERCÍCIO EM CADEIA CINÉTICA FECHADA (AGACHAMENTO) SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NEUROENDÓCRINOS E A SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESEMPENHO E A CAPACIDADE FUNCIONAL EM IDOSOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO.

**Tese apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Sociedade Brasileira de Fisiologia na UFVJM, na área de Ciências Biológicas II, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.**

**Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Cristina Rodrigues Lacerda**
**Co-orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra**

**DIAMANTINA - MG**
**2013**

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

S588e
2013

Simão, Adriano Prado
Efeitos da adição da vibração de todo o corpo ao exercício em cadeia cinética fechada (agachamento) sobre parâmetros inflamatórios e neuroendócrinos e a sua associação com o desempenho e a capacidade funcional em idosos com osteoartrite de joelho. / Adriano Prado Simão. – Diamantina: UFVJM, 2013.
196 p. : il.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Cristina Rodrigues Lacerda
Coorientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Tese (doutorado) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.

1. Osteoartrite. 2. Idosos. 3. Receptores solúveis de TNF-alfa. 4. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 5.Vibração de todo o corpo. I. Lacerda, Ana Cristina Rodrigues. II. Coimbra, Cândido Celso. III. Título.

**CDD 616.72**

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

# EFEITOS DO EXERCÍCIO EM CADEIA CINÉTICA FECHADA (AGACHAMENTO) REALIZADO EM PLATAFORMA VIBRATÓRIA SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E HORMONAIS E A SUA ASSOCIAÇÃO COM A CAPACIDADE FUNCIONAL EM IDOSOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO

**Adriano Prado Simão**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Doutorado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

APROVADA EM 22 / 11 / 2013

Prof. Cândido Celso Coimbra – UFMG

Prof.ª Janetti Nogueira Francischi – UFMG

Prof.ª Leani Souza Máximo Pereira – UFMG

Prof. Ronaldo Luis Thomasini – UFVJM

Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo – UFVJM

Prof.ª Ana Cristina Rodrigues Lacerda
Presidente

DIAMANTINA
2013

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

- Paulo Freire -

## Dedico este trabalho:

Aos meus amados e queridos pais (Suely Prado Simão e José Benedito Simão) tudo o que faço e conquisto em minha vida é pensando em vocês. Agradeço os ensinamentos e as orações que sempre me dão força nos momentos em que eu mais preciso. Vocês são exemplos de vida para mim.

A minha amada e adorável esposa Roseli, meu eterno amor, minha princesa. Seu carinho, dedicação à família e sua forma positiva de enfrentar as dificuldades da vida, foram incentivos determinantes para eu chegar até aqui.

Aos meus eternos e adoráveis filhos Breno e Adrian, duas joias raras em minha vida, pelo carinho, pela atenção e permissão das minhas ausências como PAI neste período para dedicação aos estudos.

A minha irmã Talita Prado Simão e seu namorado Júnior pela carinho, pela torcida e pelo incentivo nesta caminhada.

A minha irmã Aline Prado Simão, meu cunhado Ednilson e minhas lindas sobrinhas Amanda e Ana Beatriz pelo carinho e incentivo apesar da distância.

A Delfina Jordão Prado (*in memorian*) minha avó materna, que estará sempre ao meu lado, aos meus avós paternos Tereza Izídia dos Santos e Benedito Flauzino Simão pela torcida e pelos ensinamentos sobre a vida.

Aos meus cunhados Neiva, Luciano, Sérgio, Arnaldo (*in memorian*) e a minha querida sogra Maria Aparecida de Lima (*in memorian*) para quem serei um eterno “fisioterapêutico”.

Aos demais familiares e amigos que mesmo a distância estiveram sempre torcendo e me incentivando a alcançar mais esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

Nesta tese de doutorado, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, não posso deixar de reconhecer a contribuição de várias pessoas. Desde o início do doutoramento, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem estas contribuições, esta investigação não teria sido possível.

Primeiramente a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades;

Aos idosos e idosas que participaram deste estudo, que tanto me ensinaram com suas sabedorias de vida, que não mediram esforços para participar dos treinamentos e acima de tudo acreditaram neste estudo;

A minha amiga e orientadora, professora Dr.ª Ana Cristina Rodrigues Lacerda, pela presença constante em todo o desenvolvimento deste estudo, pela orientação, confiança que depositou no meu trabalho e pela amizade;

Ao professor Dr. Cândido Celso Coimbra, pelo apoio em todas as fases desse estudo;

Ao professor Cláudio Heitor Balthazar, pela imprescindível ajuda na viagem até Santos e o grande auxílio e ensinamentos nas análises hormonais;

À professora Regina Célia Spadari pela estrutura laboratorial na UNIFESP-Campus Baixada Santista permitindo as análises hormonais;

À professora Vanessa Amaral Mendonça pelo auxílio e ensinamentos nas análises das citocinas pelo ELISA;

Ao Dr Sérgio Antunes Santos pela sua disposição, compromisso e parceria nas coletas de líquido sinovial e sangue.

Ao Hospital Nossa Senhora da Saúde de Diamantina pela parceria e pela permissão para realização deste estudo.

Aos professores Mauro Martins Teixeira e Antônio Lúcio Teixeira pelas valiosas contribuições nas escritas dos artigos e empréstimo da estrutura laboratorial na UFMG para as análises com ELISA;

Ao Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, à Profª Drª Leani Souza Máximo Pereira e à Profª Drª Janetti Nogueira de Francischi, membros da minha banca de qualificação, pelas orientações e sugestões que ajudaram a engradecer este estudo nesta reta final.

Aos professores do programa Multicêntrico (PMCF) – UFVJM, pelos ensinamentos durante as discussões multiprofissionais e nas disciplinas que contribuíram para o meu crescimento profissional;

Aos meus colegas do LAFIEX e LIM, pelo aprendizado adquirido nas apresentações dos projetos, artigos e pelas valiosas discussões científicas;

Ao meu grande amigo Prof. Wellington Fabiano Gomes, pela amizade, auxílio nas viagens e estadia em Belo Horizonte e pelas valiosas discussões dos artigos da *Nature*, durante as disciplinas na UFMG;

Aos alunos de iniciação: Bruno, Tássio, Rosalina e Camila que estavam sempre dispostos durante as incansáveis coletas no hospital e aos finais de semana e por toda a parceria desenvolvida;

Ao Departamento de Fisioterapia da UFVJM pelas liberações nos momentos oportunos que contribuíram para facilitar esta caminhada;

A todos meus amigos e colegas que direta ou indiretamente torceram por mim e me apoiaram nesta longa caminhada;

Aos mentores da Proposta de Criação do Programa Multicêntrico, por nos terem oferecido a oportunidade de ingressar em um programa inovador que oferece a possibilidade de um amplo aprendizado através de um convívio essencialmente multiprofissional;

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro;

Aqueles não lembrados ou não citados, por favor me perdoem a injustiça do esquecimento.

# RESUMO

**Introdução:** Recentemente, a vibração de todo o corpo (VTC) tem sido um método de exercício físico indicado para aumentar o desempenho e a capacidade físico-funcional de idosos com osteoartrite (OA) de joelho. No entanto, os mecanismos relacionados aos efeitos produzidos por essa modalidade ainda não foram completamente investigados. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da adição de VTC aos exercícios de agachamento na concentração plasmática de marcadores inflamatórios e no desempenho e capacidade funcionais de idosos com OA de joelho na fase remissiva da doença (Estudo 1) e investigar os efeitos da adição do treinamento de VTC ao exercício de agachamento em mulheres idosas com OA de joelho na fase remissiva da doença nos seguintes parâmetros: 1) força isométrica do músculo quadríceps; 2) concentração plasmática de BDNF; e 3) na concentração salivar da razão testosterona/cortisol (Estudo 2). Investigar a relação entre os níveis plasmáticos e no líquido sinovial do TNF-α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) assim como de BDNF em idosos com OA de joelho e ainda verificar a relação destes com a gravidade da OA e o autorrelato de dor, rigidez e função física com o WOMAC (*Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index)* em idosos com OA de joelho na fase inflamatória aguda (Estudo 3). **Metodologia:** No estudo 1, trinta e dois idosos com OA de joelho foram divididos em três grupos: grupo que realizou exercício de agachamento associado a plataforma vibratória (grupo plataforma N=11), grupo que realizou exercício de agachamento sem vibração (grupo agachamento N=10) e o grupo controle (N=11). Um programa estruturado de exercícios de agachamento foi executado três vezes por semana em dias alternados por doze semanas nos grupos plataforma e agachamento. A concentração plasmática de receptores solúveis de TNF-α (sTNFR1 e sTNFR2) foi analisada usando a técnica de *ELISA*. O WOMAC foi usado para avaliar o autorrelato da função física, dor e rigidez. O teste de caminhada de 6 minutos, a escala de Berg e o teste de velocidade da marcha foram utilizados para avaliar a função física. No estudo 2, foram selecionadas quinze mulheres idosas com idade maior ou igual a 60 anos que tinham sido diagnosticadas com OA em pelo menos um joelho. A intervenção consistiu de doze semanas seguidas de exercícios de agachamento, 3 vezes por semana. O protocolo de exercício foi similar em ambos os grupos diferindo apenas da presença de vibração. Já no estudo 3 participaram vinte e sete idosos diagnosticados com osteoartrite de joelho e dezenove idosos saudáveis. Radiografias ântero-posteriores do joelho foram realizadas para determinar a gravidade da doença no joelho afetado. A classificação radiográfica da OA do joelho foi realizada utilizando os critérios Kellgren-Lawrence. Os níveis de TNF-α, sTNFR1, sTNFR2 e

BDNF no plasma e no líquido sinovial foram determinados por ELISA. **Resultados:** No estudo 1, o grupo que realizou exercícios de agachamento na plataforma vibratória mostrou diminuição nas concentrações plasmáticas dos marcadores inflamatórios sTNFR1 e sTNFR2 ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente), no autorrelato da dor ($p<0,05$), melhora no equilíbrio ($p<0,05$) e na velocidade e distância caminhada ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente) comparado com o grupo controle. O teste de velocidade da marcha também apresentou aumento no grupo plataforma quando comparado ao grupo agachamento ($p<0,01$). Os resultados do estudo 2 demonstraram uma variação ($\Delta$) positiva dos valores da força isométrica muscular do quadríceps ($p=0,02$) e da concentração plasmática de BDNF ($p=0,03$) no grupo vibração após o período de intervenção. A variação ($\Delta$) na razão testosterona/cortisol (T/C) não diferiu significativamente, entre os grupos ($p=0,61$). No estudo 3, os níveis de BDNF no líquido sinovial correlacionou-se significativamente com dor autorrelatada [WOMAC] ($rs = 0,39$, $p=0,04$). Com relação aos receptores solúveis para TNF-α, observou-se uma diferença entre os níveis de sTNFR1 e de sTNFR2, tanto no plasma quanto no líquido sinovial em pacientes com OA do joelho (1091 ± 99,48 pg / mL versus 2249 ± 126,3 pg / mL e 2587 ± 66,12 pg / mL versus 2021 ± 107,0 pg / mL, respectivamente). Além disso, os níveis de sTNFR1 no líquido sinovial foram, negativamente, correlacionadas com a dor e a função física autorrelatada ($r_s$ -0,6785, $p<0,0001$ e $r_s$ -0,4194; $p=0,03$, respectivamente). Ao passo que, os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial foram negativamente correlacionadas com dor e rigidez articular ($r_s$ -0,5433, $p=0,01$ e $r_s$ -0,4249; $p=0,02$, respectivamente). **Conclusões:** Os resultados dos estudos supracitados indicam que a adição da vibração de todo o corpo ao treinamento com exercício de agachamento, nas condições experimentais propostas, melhora o equilíbrio estático e dinâmico e o desempenho da marcha e ao mesmo tempo reduz a autopercepção de dor e a concentração de marcadores inflamatórios (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA de joelho na fase de remissão da doença. Além disso, a associação da vibração de todo o corpo ao exercício de agachamento promove uma melhora na força muscular de membros inferiores em mulheres idosas com OA de joelho na fase de remissão da doença e proporciona uma resposta adaptativa na concentração de BDNF sem alteração na relação muscular de anabolismo/catabolismo. Já os resultados da relação entre sistêmico e local, indicam que os níveis de BDNF sistêmicos estão associados com o mecanismo da dor articular na OA de joelho. Com relação aos receptores solúveis de TNF-α, evidenciou-se a presença de receptores solúveis para TNF-α no líquido sinovial de pacientes com OA primária de joelho e a relação destes receptores com parâmetros clínicos.

**Palavras chave:** Osteoartrite; Idosos; Receptores solúveis de TNF-alfa; Fator neurotrófico derivado do cérebro; Vibração de todo o corpo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Recently, whole body vibration (WBV) has been an alternative method of exercise that has been indicated to improve the physical performance of the elderly with osteoarthritis (OA) knee. However, the mechanisms related to the effects produced by this training mode have not been fully elucidated in the literature. **Objectives:** 1) To investigate the effects of the adittion of whole-body vibration to squat exercises on the plasma concentration of inflammatory markers and the functional performance of elderly individuals with knee OA remission phase (Study 1) and investigate the effects of WBV in addition to squat exercise training in elderly women with knee OA remission phase on the following parameters: 1) isometric strength of the quadriceps muscle; 2) BDNF plasma concentration; and 3) the testosterone/cortisol salivary concentration ratio (Study 2). 3). To analyze the concentrations of TNF-α, soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) and BDNF in both plasma and synovial fluid of patients with inflammatory acute phase primary knee osteoarthritis during inflammatory acute phase, and to determine the possible correlations of plasma and synovial fluid TNF-α, soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) and BDNF with the radiographic grading of knee OA and with self-reported pain, stiffness and physical function (Study 3). **Methods:** In study 1 thirty-two elderly subjects with knee osteoarthritis were divided into three groups [i.e., squat exercises on a vibratory platform (platform group N= 11), squat exercises without vibration (squat group N= 10) and the control group (N=11)]. The structured program of squat exercises in the platform and squat groups was conducted three times per week, on alternate days, for twelve weeks. The plasma concentration of TNF-α soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) were analyzed using ELISA. The Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC) questionnaire were used to evaluate self-reported physical function, pain and stiffness. The 6-minute walk test, the Berg balance scale, and gait speed were used to evaluate physical function. In study 2 the eligible patients were fifteen (15) elderly women ≥ 60 years of age who had been diagnosed with OA in at least one knee. The intervention consisted of uninterrupted squatting exercises for twelve weeks, 3x/week. The exercise protocol was similar in both groups differing only in the presence of vibration. In study 3 samples of plasma taken from the peripheral blood and of synovial fluid taken from the knee of patients with osteoarthritis (OA) were collected (n=27). Anteroposterior knee radiographs were taken to determine disease severity in the affected knee. Radiographic grading of OA in the knee was performed using the Kellgren-Lawrence criteria. Furthermore, plasma was collected from the peripheral blood of 19 healthy individuals, with no radiographic change in the hips and knees.

The Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC) questionnaire was used to evaluate self-reported physical function, pain and stiffness. ELISA measured the TNF-α, sTNFR1, sTNFR2 and BDNF levels in the plasma and synovial fluid. **Results:** In the study 1 the group that performed squat exercises on a vibratory platform, there were significant differences in plasma concentrations of the inflammatory markers sTNFR1 and sTNFR2 ($p<0.001$ and $p<0.05$, respectively), self-reported pain ($p<0.05$), balance ($p<0.05$) and speed and distance walked ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively) compared with the control group. The gait speed test also showed significant differences between the squat and platform groups ($p<0.01$). In the results of the study 2, the VG group demonstrated a significantly greater change (Δ) in IQMS values ($p = 0.02$) and in BDNF plasma concentrations ($p = 0.03$) after the intervention period compared with the EG group. The change (Δ) in T/C ratio showed no difference between the groups ($p = 0.61$). In the results of the study 3, the plasma BDNF levels significantly correlated with self-reported pain [WOMAC] ($r_s=0.39$, $p=0.04$). According to soluble receptors to TNF-α, there was a difference between sTNFR1 and sTNFR2 levels in plasma as well as in synovial fluid in patients with knee (1091 ± 99,48 pg / mL versus 2249 ± 126,3 pg / mL e 2587 ± 66,12 pg / mL versus 2021 ± 107,0 pg / mL, respectively). Synovial fluid sTNFR1 levels were negatively correlated with pain and physical function self-reported ($r_s$-0.6785, $p<0.0001$ and $r_s$-0.4194, $p=0.03$, respectively). Synovial fluid sTNFR2 levels were negatively correlated with pain and joint stiffness ($r_s$-0.5433, $p=0.01$ and $r_s$-0.4249, $p=0.02$, respectively). **Conclusions:** The results of the above studies indicate that the addition of vibration training the whole body to squat exercise in the experimental conditions resulted in improvement in static and dynamic balance and gait performance and reduced the self-perception of pain and the concentration of inflammatory markers (sTNFR1 and sTNFR2) in elderly patients with knee OA. We also demonstrate that the combination of vibration training the whole body to squat exercise can promote an improvement in lower limb muscle strength in elderly women with knee OA and still provide an adaptive response to the concentration of BDNF compared with no change in muscle anabolism/catabolism. The results of the relationship between systemic and local concentration indicate that the systemic BDNF levels are associated with the mechanism of joint pain in knee OA. With respect to TNF-α soluble receptors, the findings demonstrated the presence of soluble receptors for TNF-alpha, particularly sTNFR1, in the synovial fluid of patients with primary knee OA and the relationship between these receptors and clinical parameters.

**Keywords:** Osteoarthritis; Elderly; TNF-α soluble receptors; Brain-derived neurotrophic factor; Whole-body vibration.

# LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Modelo explicativo do estudo .....29

**Figura 2 –** Esquema demonstrando as etapas do protocolo experimental.....30

**Figura 3 –** Fluxograma do estudo 1.....33

**Figura 4 –** Variação na concentração plasmática de sTNFR1 (A) e sTNFR2 (B) antes e após o período de intervenção (delta = Δ). ** p<0,01 e * p<0,05 para grupo plataforma versus grupo controle.....40

**Figura 5 –** Variações do autorrelato de dor (A) e no equilíbrio, o qual foi avaliado pela escala de equilíbrio de Berg (B), distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos (C) e velocidade da marcha (D) antes e após o período de intervenção (delta = Δ). * p<0,05 and *** p<0,001 para grupo plataforma versus grupo controle. ** p<0,01 grupo plataforma versus grupo agachamento.....41

**Figura 6 –** Fluxograma do estudo 2.....47

**Figura 7 – (A)** Variação da força isométrica do músculo quadriceps (FIMQ) antes e após o período de intervenção (delta = Δ) no grupo vibração (GP) e grupo agachamento (GA). Os dados são apresentados como média e desvio padão. *GP apresenta diferença significativa de GA, p≤0,05. **(B)** A variação na concentração plasmática de BDNF antes e após o período de intervenção (delta = Δ) no grupo vibração (GP) e no grupo agachamento (GA). Os dados são apresentados como média e desvio padão. *GP apresenta diferença significativa de GA, p≤0,05.....53

**Figura 8 –** Diagrama de dispersão mostrando a correlação positiva entre os valores de delta (Δ) da força isométrica dos músculos quadríceps (FIMQ) e a concentração plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em mulheres idosas com osteoartrite (OA) do joelho.....54

**Figura 9 –** A alteração dos razões testosterona/cortisol [níveis basais, antes e após o período de intervenção (delta = Δ)] no grupo de vibração (GP) e o grupo de agachamento (GA). Os

dados são apresentados como média e desvio padrão. * GP é significativamente diferente de GA, $p \leq 0,05$.....54

**Figura 10 –** Níveis de BDNF no plasma e líquido synovial de pacientes com OA e controles.....64

**Figura 11 –** Correlação positiva entre os níveis plasmáticos de BDNF em pacientes com OA de joelho e o autorrelato de dor (WOMAC) ($r_s$=0,39; p=0,04).....64

**Figura 12 – A)** Níveis dos receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa 1 (sTNFR1) no plasma e no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) (n= 27) e no plasma de controles saudáveis (n= 19), **B)** níveis dos receptores do fator de necrose tumoral alfa 2 (sTNFR2) no plasma e no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) (n= 27) e no plasma de controles saudáveis (n= 19). As linhas horizontais (em negrito) indicam os valores médios.....65

**Figura 13 –** Níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial e no plasma de pacientes com osteoartrite de joelho. As linhas horizontais (em negrito) indicam os valores médios.....66

**Figura 14 –** Correlação negativa entre os níveis de receptores solúveis do fator de necrose tumoral (sTNFR) no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite do joelho (OA) com os parâmetros clínicos e funcionais (WOMAC). **A)** Níveis de sTNFR1 no líquido sinovial se relacionaram negativamente com a intensidade da dor (WOMAC), **B)** os níveis de sTNFR1 no líquido sinovial se relacionaram negativamente com o desempenho funcional (WOMAC), **C)** os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial se relacionaram negativamente com a intensidade da dor (WOMAC), **D)** níveis de sTNFR2 no líquido sinovial se relacionaram negativamente com a rigidez articular (WOMAC).....67

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 –** Progressão do treinamento utilizando exercícios de agachamento sem (GA) e com vibração de todo o corpo (GP).....31

**Tabela 2 –** Caracterização da amostra do estudo 1.....38

**Tabela 3 –** Valores pré-teste e pós-teste da avalição do desempenho, da capacidade funcional e da concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2.....39

**Tabela 4 –** Teste *post hoc* (delta) da avaliação do desempenho, da capacidade funcional e da concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2.....41

**Tabela 5 –** Caracterização da amostra do grupo vibração (GP) e grupo agachamento (GA). Dados apresentados como média (SD). $p \leq 0,05$.....51

**Tabela 6 –** Variáveis (antes e após treinamento) do grupo vibração (GP) e grupo agachamento (GA). Dados apresentados em media (±). $p < 0,05$…….....52

**Tabela 7-** Caracterização da amostra dos grupos OA e controle (Estudo 3).....63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AMPK | proteína quinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*) |
| BDNF – | Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor)* |
| BSA – | Soro albumina bovina (*Bovine serum albumin*) |
| CIVM – | Contração isométrica voluntária máxima |
| ELISA – | Ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*) |
| FIMQ – | Força isométrica muscular do quadríceps |
| GA – | Grupo alongamento |
| GP – | Grupo plataforma |
| ICC – | Coeficiente de correlação intraclasse (*intra-class correlation coefficient)* |
| IL-1 – | Interleucina 1 |
| IL-6 – | Interleucina 6 |
| OA – | Osteoartrite |
| PBS – | Tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*) |
| SNS – | Sistema nervoso simpático |
| sTNFR1 – | Receptor solúvel do fator de necrose tumoral alfa 1 (*Soluble tumour necrosis factor receptors 1*) |
| sTNFR2 – | Receptor solúvel do fator de necrose tumoral alfa 2 (*Soluble tumour necrosis factor receptors 2*) |
| T/C – | Razão testosterona/cortisol |
| TACE – | Enzima proteinase de conversão do fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor-α-converting enzyme)* |
| TNFR1 – | Receptor de membrana do fator de necrose tumoral alfa 1 (*tumour-necrosis factor receptor-1*) |
| TNFR2 – | Receptor de membrana do fator de necrose tumoral alfa 2 (*Tumor necrosis factor receptor 2)* |
| TNF-α – | Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*) |
| VTC – | Vibração de todo o corpo |
| WOMAC – | *Western Ontario and Mcmaster universities osteoarthritis index* |

# SUMÁRIO

**1.** Introdução..... 17

**1.1** Osteoartrite (OA)..... 17

**1.2** Parâmetros inflamatórios na osteoartrite..... 18

**1.3** Exercício físico na OA..... 21

**1.4** Vibração de todo o corpo (VTC)..... 22

**1.5** Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)..... 23

**1.6** Hormônios versus Força muscular..... 23

**1.7** Hipóteses..... 25

**2.** Objetivos..... 26

**2.1** Objetivo geral..... 26

**2.2** Objetivos específicos..... 26

**3.** Justificativa..... 27

**4.** Metodologia..... 28

**4.1** Similaridades entre os estudos……..……. 29

**4.1.1** Aplicação dos protocolos de treinamento (Estudos 1 e 2)..... 29

**4.1.2** Protocolo das análises de ELISA (plasma e líquido sinovial)..... 31

**4.2 Estudo 1:** Investigar os efeitos do exercício de agachamento combinado com a vibração de todo o corpo nas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e no desempenho e capacidade funcional em idosos com osteoartrite de joelho..... 32

**4.2.1** Método..... 32

**4.2.1.1** Participantes..... 32

**4.2.1.2** Procedimentos..... 33

**4.2.1.3** Análises dos marcadores inflamatórios..... 34

**4.2.1.4** Avaliação radiográfica..... 34

**4.2.1.5** Avaliação do desempenho e da capacidade funcional..... 34

**4.2.1.6** Análise estatística..... 36

**4.2.2** Resultados..... 38

**4.2.3** Discussão..... 42

**4.2.4** Principais achados..... 45

**4.3 Estudo 2:** Investigar os efeitos da adição da vibração de todo o corpo ao treinamento de agachamento sobre a força muscular isométrica, na concentração plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro e na concentração salivar em repouso da razão testosterona/cortisol em idosos com osteoartrite de joelho..... 45

**4.3.1** Método..... 45

**4.3.1.1** Participantes..... 46

**4.3.1.2** Procedimentos..... 47

**4.3.1.3** Avaliação da força isométrica do músculo quadríceps (FIMQ)..... 48

**4.3.1.4** Análise dos níveis plasmáticos de BDNF..... 48

**4.3.1.5** Coleta salivar e análise hormonal..... 49

**4.3.1.6** Análise estatística..... 49

**4.3.2** Resultados..... 52

**4.3.3** Discussão..... 55

**4.3.4** Principais achados..... 58

**4.4 Estudo 3:** Investigar a relação entre as concentrações plasmáticas e no líquido sinovial de BDNF, TNF-α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA de joelho e ainda verificar a relação destes com a gravidade da OA e o autorrelato de dor, rigidez e função física (WOMAC) em idosos com OA de joelho..... 59

**4.4.1** Método..... 60

**4.4.1.1** Participantes..... 60

**4.4.1.2** Procedimentos..... 60

**4.4.1.3** Avaliação radiográfica e dos parâmetros clínicos e funcionais..... 61

**4.4.1.4** Processamento do plasma e do líquido sinovial..... 61

**4.4.1.5** Análise dos níveis de BDNF, TNF-α, sTNFR1 e sTNFR2 no plasma e no líquido sinovial..... 62

**4.4.1.6** Análise estatística..... 62

**4.4.2** Resultados..... 63

**4.4.2.1** BDNF..... 63

**4.4.2.2** Receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2)..... 65

**4.4.3** Discussão..... 67

**4.4.4** Principais achados..... 72

**5.** Conclusões..... 73

**6.** Referências bibliográficas..... 74

**7.** Anexos..... 91

**7.1** Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética m Pesquisa (Estudos 1 e 2)..... 91

**7.2** Anexo 2 – *Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index*…… 92

**7.3** Anexo 3 – Escala de Equilíbrio de BERG..... 95

**7.4** Anexo 4 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Estudo 3)..... 102

**7.5** Artigo 1..... 104

**7.6** Artigo 2..... 114

**7.7** Artigo 3..... 154

**7.8** Artigo 4..... 169

# 1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que o Brasil vem passando por uma mudança no perfil demográfico da sua população. Este fenômeno, chamado de transição demográfica, reflete alguns fatores, como a queda da fecundidade materna e da mortalidade infantil, a redução número de mortes causadas por doenças infecto-contagiosas, o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento progressivo da população (MINAYO, 2012).

Assim, o Brasil está deixando para trás o seu perfil de "um país de jovens", devido ao aumento no número de idosos. Em 1991, os idosos correspondiam a 7,3% (10,7 milhões) da população brasileira, de acordo com o censo de 2010, esse índice subiu para 10,7% (20,5 milhões). As projeções indicam que, em 2020, 13,6% da população brasileira será constituída por pessoas idosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE–BR, 2010). Nas suas políticas, o Brasil adota a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de utilizar a idade de 60 anos como um ponto de corte para definição de idosos nos países em desenvolvimento (VERAS *et al*., 1987).

Atualmente, o perfil dos idosos é definido com uma maior prevalência (55.5%) de mulheres viúvas com baixa renda e baixa escolaridade (GARRIDO & MENEZES, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE-BR, 2010). Este fato vem sendo denominado como fenômeno da feminilização da velhice segundo especialistas em gerontologia (BERQUÓ, 1996; CHAIMOWICZ, 1997; VERAS, 2003; GARRIDO & MENEZES, 2002).

Mais da metade dos idosos (53,3%) apresenta algum problema de saúde sendo que, destes, 23,1% são portadores de doenças crônicas (GARRIDO & MENEZES, 2002). Portanto, este processo de transição epidemiológica que vem ocorrendo nos últimos anos em países tanto desenvolvidos quanto em desenvolvimento, transformou o paradigma de saúde, fazendo com que, hoje, doenças crônicas e degenerativas como a osteoartrite (OA) – que afetam freqüentemente a população idosa feminina – venham a assumir papel de “destaque” (RAMOS, 2003; WANNMACHER, 2006).

## 1.1 Osteoartrite (OA)

A OA é a forma mais comum de artrite e a maior causa de dor e disfunção em idosos (LOESER, *et al*., 2012). Ao longo do século 20, a definição de osteoartrite evoluiu consideravelmente, de "artrite hipertrófica” para uma definição de consenso mais recente: “OA passou a ser considerada uma doença derivada do resultado de eventos, tanto mecânicos quanto

biológicos que desestabilizam o equilíbrio normal entre a degradação e a síntese dos condrócitos articulares, da matriz extracelular, da cartilagem e do osso subcondral" (SHARMA *et al*., 2003).

Atualmente, a OA é definida como uma doença crônica, progressiva, degenerativa de etiologia multifatorial, envolvendo fatores biomecânicos, bioquímicos e genéticos que contribuem para o desequilíbrio entre a síntese e a destruição da cartilagem articular (LOESER *et al*., 2012; GOLDRING & GOLDRING, 2004; SHARMA *et al*., 2003). Quando clinicamente evidente, a OA é caracterizada por dor articular, rigidez, inchaço, diminuição da força muscular e da funcionalidade e graus variáveis de inflamação (LOESER *et al*., 2012; MICHAEL *et. al*., 2010; ZACARON *et al*., 2006).

Dentre as articulações acometidas, o joelho é a fonte mais comum da OA, afetando cerca de 7% das pessoas com idade entre 65 e 70 anos e 11,2% daqueles com mais de 80 anos (KEVIN *et al*., 2012; MARX *et al*., 2006). De acordo com uma meta-análise realizada por Srikanth *et al*. (2005), a prevalência e a incidência de OA diferem entre homens e mulheres, sendo que as mulheres mostram prevalência e gravidade, significativamente, maiores da OA do joelho.

## 1.2 Parâmetros inflamatórios na osteoartrite

A degradação da cartilagem articular do joelho pela OA causa um processo inflamatório devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias, mediadores endógenos das reações inflamatórias, responsáveis pela digestão proteolítica da cartilagem articular (PENNINX *et al*., 2004). Esta reação inflamatória exibe características de uma resposta imune dependente de célula T, caracterizada pela presença de um infiltrado de células T (frequentemente nodular), ), apresentação de antígenos para ativação de células T, produção de citocinas Th1, e de células T oligoclonais na membrana sinovial (MOSMANN & SAD, 1996).

As células T que se desenvolvem no timo dividem-se em duas classes principais: as células T citotóxicas e as células T auxiliares ou helper (Th). Quando ativadas por uma célula apresentadora de antígeno, uma célula T auxiliar virgem pode diferenciar-se em dois tipos distintos de células T auxiliares efetoras, denominadas Th1 e Th2 (CHEWINSKI et al., 1987). As citocinas, cuja produção é modulada pelas células T, são polipeptídios de baixo peso molecular, produzidos a partir de diversas células estimuladas: macrófagos, linfócitos, células endoteliais, musculares, fibroblastos e adipócitos. São consideradas como responsáveis por regular e modular as respostas imunológicas inibindo ou estimulando a ativação, proliferação e diferenciação de diversos tipos de células regulando a secreção de anticorpos e de outros

mediadores e, consequentemente, controlando ou perpetuando o processo inflama (MOSMANN & SAD, 1996; SAKKAS & PLATSOUCAS, 2007).

Já está bem documentado que a osteoartrite está associada a altos níveis de marcadores inflamatórios tais como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e receptores solúveis para TNF-α (sTNFR1 e sTNFR2) (GOEKOOP et. al., 2010; KUETTNER & COLE, 2005; MILLER et. al., 2008). Concomitantemente, idosos frequentemente apresentam um baixo grau de inflamação. Recentemente, estudos têm explorado a importância clínica do aumento de níveis circulantes de mediadores inflamatórios, principalmente de IL-6 e TNF-α (KRABBE et al., 2004).

A interleucina-1 (IL-1) é produzida por condrócitos, fagócitos mononucleares, osteoblastos e pelo tecido sinovial em resposta à lesão da cartilagem articular. Sendo considerada uma citocina pró-inflamatória importante na instalação do processo inflamatório. Sua função seria induzir os condrócitos e os sinoviócitos a produzirem as metaloproteinases e prostaglandinas, além de deprimir a síntese do colágeno tipo II e dos proteoglicanos (reparadores da cartilagem) e somatomedinas que impedem a proliferação dos condrócitos. A IL-1 também aumenta a produção do óxido-nítrico, a qual induz o desarranjo estrutural dos condrócitos (BONDESON *et. al*., 2008).

A Interleucina-6 (IL-6), que tem sido chamada de citocina dos gerontologistas, tem sido indicada como uma das principais vias de sinalização que modulam a complexa relação entre o envelhecimento e a morbidade crônica (ERSHLER, 1993). Na OA, a IL-6 é induzida pelas citocinas IL-1 e TNF-α e desempenha um papel de modulação do processo inflamatório articular (KAAPOR et al., 2011; GOLDRING, 2000). Essa citocina é considerada um potencial biomarcador para o desenvolvimento da OA, podendo fornecer informações para a constituição do prognóstico da doença (LIVSHITS et. al., 2009). De acordo com estudo recente in vitro, níveis elevados de IL-6 parecem promover o metabolismo anabólico de condrócitos residentes, beneficiando a formação de neocartilagem durante a regeneração (TSUCHIDA et al., 2012).

O fator de necrose tumoral (TNF-α) é uma potente citocina, predominantemente pró-inflamatória e catabólica envolvida na iniciação e progressão da osteoartrite (GOLDRING, 2000; GOLDRING & GOLDRING, 2004) e é produzida, principalmente, por fagócitos estimulados pela IL-1 (ADERKA et. al., 1992). Os sinais intracelulares para a resposta ao TNF-α são fornecidos pelos receptores de superfície celular, classificados em duas espécies distintas, TNFR1 e TNFR2, com as quais o TNF-α apresenta alta afinidade de ligação. O TNFR1 é expresso pela maioria dos tipos celulares, enquanto o TNFR2 é expresso principalmente por células de origem hematopoiéticas e células endoteliais (WAETZIG et. al., 2005). Ambos os

receptores para TNF-α também existem nas formas solúveis (sTNFR1 e sTNFR2), aparentemente derivados por clivagem das formas encontradas na superfície celular pela enzima proteinase conversora de TNF-α (TACE). Estes receptores solúveis do TNF-α concorrem com o receptor de superfícies na ligação com o TNF-α modulando sua atividade inflamatória, sendo sugerido que eles funcionam como atenuadores fisiológicos da atividade degradativa do TNF-α (ADERKA et. al., 1992; WAETZIG et. al., 2005). Segundo Penninx et. al. (2004), níveis elevados de receptores solúveis de TNF-α estão associados com a diminuição da função física, aumentos dos sintomas da OA (por exemplo, um aumento da dor e rigidez), e piores escores radiográficos em idosos obesos com OA do joelho. Vale mencionar que os voluntários deste estudo encontravam-se na fase de remissão da OA. Assim, os resultados encontrados por esse estudo não podem ser extrapolados para outros estudos que avaliaram as concentrações destes receptores solúveis na fase aguda da OA.

A detecção e a quantificação de citocinas têm sido realizadas local e sistemicamente. Localmente, é realizada por meio do líquido sinovial que permite monitorar as alterações da cartilagem articular e promove melhor entendimento da fisiopatologia da OA. Pesquisas com o líquido sinovial podem refletir mais precisamente o processo inflamatório presente em articulações osteoartríticas (PETERSSON et. al., 1997; CARAMES et. al., 2008).

Apesar do líquido sinovial ser considerado o melhor fluído para a análise dos eventos ocorridos dentro da articulação (FERNANDES et al., 2002), a análise sistêmica, por meio do plasma, é menos invasiva e pode ser utilizada em mensurações repetidas com resultados confiáveis, sendo amplamente utilizada nas pesquisas com OA, além de permitir, ainda, avaliar resultados de terapêuticas de longo prazo (BONDESON et al., 2008). Entretanto, as citocinas e as suas concentrações presentes no líquido sinovial e no plasma, em geral, não são as mesmas. Desta forma, a determinação da relação entre as concentrações plasmáticas e o líquido sinovial poderia facilitar o entendimento da fisiopatologia local e sistêmica da OA, além de permitir a inferência dos eventos locais a partir da análise do sangue periférico.

Recentemente, vários estudos têm avaliado e estabelecido a relação entre a concentração de marcadores da OA sistêmica e local (plasma e líquido sinovial), tais como: fator de crescimento de fibroblasto básico [bFGF] (HONSAWEK et al., 2012); Receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada [sRAGE] (HONSAWEK E CHAYANUPATKUL, 2010) e proteína óssea morfogenética-7 [BMP-7] (HONSAWEK et al., 2009). No entanto, não encontramos na literatura atual, estudos avaliando a relação entre a concentração plasmática e o líquido sinovial de TNF-α, sTNFR1, sTNFR2 e BDNF em pacientes com OA.

## 1.3 Exercício físico na OA

Os benefícios do exercício físico são evidentes, não somente em pessoas saudáveis, mas também em pacientes (VINA et al., 2012). Estudos observacionais e randomizados têm mostrado que a prática regular de exercício físico contribui para o tratamento de várias doenças crônicas (AVELAR et al., 2011; GOMES et al., 2012; WARBURTON et al., 2006).

A dor e o aumento do líquido intra-articular, que são comuns na OA do joelho, sensibilizam os mecanorreceptores capsulares que enviam sinais para interneurônios inibitórios medulares. Esses interneurônios inibem os neurônios motores alfa e, consequentemente, os sinais que seriam transmitidos para os grupos musculares, especialmente o quadríceps. Este fenômeno, denominado inibição muscular artrogênica é, provavelmente, gerado pela informação aferente anormal da articulação afetada, resultando na diminuição da ativação dos músculos que nela atuam, (McNAIR et al., 1996), progredindo para uma perda de massa muscular e influenciando o desempenho de atividades da vida diária como caminhar, subir escadas e levantar uma cadeira (SHARMA et al., 2003; GLASS et al., 2013). É oportuno mencionar que os exercícios de agachamento, por mimetizarem as atividades de vida diária supracitadas, são usualmente recomendados para idosos como parte de um programa de treinamento envolvendo várias atividades esportivas e recreacionais, bem como durante reabilitação, objetivando o aumento da força muscular e o desempenho funcional (FLANAGAN et al., 2003). Além disso, a perda muscular relacionada à idade é também um resultado da redução do tamanho e número de fibras musculares, possivelmente devido a um processo multifatorial que envolve a inatividade física, a ingestão nutricional, estresse oxidativo e alterações hormonais que correspondem a uma condição conhecida como sarcopenia. Devemos, ainda, considerar a marcada perda de motoneurônios e brotamento neuromuscular anormal observados em mamíferos de idade avançada (McNair et al., 1996).

Apesar do processo de degradação da cartilagem articular ser considerado irreversível, sabe-se que ele pode ser estabilizado ou retardado com atividades físicas que melhorem a força e a propriocepção nos membros inferiores (ENGLUND, 2010; JAN et al., 2009; DUNLOP et al., 2010). O maior desafio do tratamento conservador da OA em idosos é encontrar atividades físicas que atuem dentro da chamada “janela terapêutica” (isto é, onde a carga seja alta o suficiente para ser efetiva, mas não alta o suficiente para causar deterioração articular). Dentro desta perspectiva, o treinamento com a vibração de todo o corpo tem sido recomendado como uma ferramenta eficiente e segura para aumentar a força muscular (VERSCHUEREN et al., 2004; ROELANTS et al., 2004) e a propriocepção (VERSCHUEREN et al., 2004) em mulheres

idosas com OA de joelho (TRANS et al., 2009; SANTOS et al., 2011). Vários outros efeitos fisiológicos também vêm sendo obtidos em resposta ao exercício agudo realizado em uma plataforma vibratória, tais como um aumento na ativação muscular (ABERCROMBY et al., 2007), melhora do desempenho físico (COCHRANE et al., 2007 e 2010) e alterações nos níveis hormonais (BOGAERTS et al., 2007; ROSCHEL et al., 2011).

### 1.4 Vibração de todo o corpo (VTC)

Os cientistas têm investigado os efeitos de vibração sobre o corpo humano durante muitos anos. Na maioria das vezes, as vibrações foram estudadas no âmbito da medicina do trabalho e consideradas como "negativas". Podemos citar, como exemplo estudos sobre os riscos à saúde decorrentes da vibração sofrida pelos motoristas de caminhões durante suas jornadas de trabalho. No entanto, durante a última década, o treinamento com VTC tornou-se muito popular como um complemento ao treinamento de força regular (JORDAN et al., 2005), em uma tentativa de aumentar sua eficácia atingindo todos os tecidos do sistema músculo-esquelético.

A VTC foi desenvolvida na década de 70 (1970) na antiga União Soviética para ser utilizada no treinamento de astronautas com o propósito de se evitar a perda mineral óssea e massa muscular durante os vôos espaciais (NAZAROV & SPIVAK, 1985), já os primeiros relatos de treinamento atlético envolvendo a VTC começaram a aparecer já no final da década de noventa (MESTER et al., 1999).

Durante esta modalidade de treinamento, o indivíduo é posicionado em ortostatismo ou realizando movimentos dinâmicos, tais como agachamento variando-se a amplitude com apoio uni- e bipodal, movimentos de flexão plantar com os pés apoiados sobre a plataforma. As vibrações estimulam os fusos musculares e os motoneurônios alfa iniciando uma contração muscular pela ativação do reflexo de vibração tônica. Esta contração muscular reflexa aumenta a sincronia das unidades motoras quando combinadas com uma contração voluntária (DELECLUSE et. al., 2003; BOGAERTES et. al., 2007). O treino em VTC é uma forma segura, adequada e um método de treinamento eficaz, que produz efeitos semelhantes ao treinamento de força regular, mas com uma menor carga sobre a articulação afetada. Por isso, torna-se uma intervenção potencialmente viável para aqueles pacientes que não podem participar de um treinamento convencional de resistência mecânica, tal como os pacientes idosos e/ou com osteoartrite do joelho (ROELANTS et al., 2004; TRANS et al., 2009; LAU et al., 2011).

Existe uma lacuna na literatura quanto à capacidade do treinamento de vibração de todo o corpo de minimizar componentes inflamatórios ou de previnir o declínio funcional e a progressão da osteoartrite de joelho em idosos. Na literatura pesquisada, até o momento, poucos estudos avaliaram o efeito do treinamento de VTC na força muscular de idosos com OA de joelho (TRANS et al., 2009; PARK et al., 2013). No estudo de Trans et al. (2009), foi demonstrado que o programa de exercício na plataforma vibratória aumentou a força muscular em comparação com o grupo controle em mulheres com OA de joelho (TRANS et al. 2009). Já no estudo de Park et al (2013), o ganho de força produzido pela associação de plataforma vibratória aos exercícios domiciliares foi similar ao grupo que realizou somente os exercícios domiciliares. No entanto, não encontramos na literatura estudos sobre os possíveis mecanismos relacionados à melhora do desempenho muscular nesta população.

### 1.5 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é um membro da família dos fatores neurotróficos que desempenha um papel chave na regulação do crescimento, sobrevivência e manutenção de neurônios (LINDSAY et al., 1994), na diferenciação, na plasticidade sináptica e eficácia da transmissão sináptica (KNAEPEN et al., 2010) e está envolvido na regeneração muscular (SAKUMA & YAMAGUCHI, 2011). Das neurotrofinas, o BDNF, que é considerado uma proteína induzida pela contração do músculo esquelético (MATTHEWS et al., 2009), parece ser a mais suscetível à regulação pelo exercício e pela atividade física (KNAEPEN et al., 2010; COELHO et al., 2012). Considerando-se, também, que, durante o exercício vibratório os estímulos mecânicos são transmitidos ao corpo estimulando as terminações primárias dos fusos musculares que, por sua vez, ativam os neurônios motores alfa, resultando em contrações musculares (TRANS et al., 2009), é possível que este tipo de treinamento possa induzir alterações nos níveis plasmáticos de BDNF, prevenindo a degeneração de motoneurônios e das inervações das fibras musculares em idosos com OA do joelho.

### 1.6 Hormônios versus Força muscular

Relatos na literatura indicam que a redução observada na força muscular ocorre em conjunto com alterações no perfil hormonal de idosos (ENEA et al., 2011). A avaliação do sistema endócrino desempenha um papel importante na determinação da resposta individual ao exercício e mudanças na concentração de testosterona e cortisol têm recebido grande atenção

devido aos seus efeitos marcantes sobre a remodelação óssea e força muscular (KRAEMER & RATAMESS, 2005, CARDINALE et al., 2010; ENEA et al., 2011). A testosterona e o cortisol parecem ser intensamente afetados por sessões de treinamento de força em homens jovens, mas não há consenso sobre as suas respostas em mulheres idosas (ERSKINE et al., 2007). Além disso, ao considerarmos o exercício ou treinamento crônico, os dados disponíveis na literatura não são conclusivos, havendo circunstâncias em que o exercício pode levar até mesmo a uma diminuição nos níveis circulantes de andrógenos. Por conseguinte, sugeriu-se que as alterações hormonais podem ter um impacto significativo na fisiologia feminina e desempenho físico (CROWLEY & MATT, 1996; UCHIDA et al., 2004; ELLOUMI et al., 2008).

Vale ressaltar que, em resposta aos agentes estressores, na tentativa da manutenção da homeostase, são ativadas respostas adaptadoras autonômicas, neuroendócrinas, hormonais e comportamentais, que incluem modificações no metabolismo e oferta de substratos energéticos (PACÀK & PALKOVITS, 2001). As respostas compensatórias desencadeadas apresentam padrões específicos. Entretanto, quando a ameaça à homeostase excede um limiar, a partir do qual são consideradas de grande magnitude, as respostas de ajuste perdem sua especificidade (CHROUSOS & GOLD, 1992; PACÀK & PALKOVITS, 2001). Os efeitos do estresse influenciam estruturas centrais e periféricas por meio da ação em receptores específicos de substâncias efetoras sintetizadas e liberadas, principalmente, pelo córtex e medula adrenal e pelo sistema nervoso simpático (SNS). Se a adaptação ao estresse falha, a concentração de corticosteróides permanece alta na circulação por muito tempo. O excesso de glicocorticóides tem consequências catabólicas (SAPOLSKY, 2000), pois estes hormônios estimulam a gliconeogênese e a proteólise, o que causa aumento da concentração plasmática de glicose e de ácidos graxos. Embora o cortisol seja fundamental para o funcionamento psiconeuroendocrino normal, aumentos crônicos na sua concentração desencadeiam efeitos negativos sobre músculos, funções imunológicas, metabolismo ósseo, humor, cognição e comportamento (KRAEMER, 2004).

O crescimento muscular esquelético é modulado por alterações tanto na síntese quanto na degradação protéica. A diminuição da concentração plasmática de cortisol e o aumento da concentração de testosterona, que devem ocorrer entre dois períodos de maior carga de trabalho, intercalados por um período de repouso, promovem a hipertrofia muscular esquelética (McMURRAY & HACKNEY, 2000), reduzindo a proteólise e aumentando a síntese protéica (KRAEMER, 2004).

A razão entre testosterona/cortisol (T/C), obtida das concentrações desses hormônios encontrados na saliva dos sujeitos estudados determina o estado de anabolismo ou de

catabolismo de substratos energéticos e, com isso, influencia a adaptação à carga de trabalho imposta (AIZAWA, 2003). Ela tem sido frequentemente utilizada como um indicador do nível de tensão que é aplicada pelo exercício. Dessa forma, alterações na concentração desses hormônios são responsáveis por modular diversas respostas induzidas pelo treinamento como hipertrofia e ganho de força (CROWLEY & MATT, 1996; UCHIDA et al., 2004).

Portanto, a investigação do efeito do treinamento de vibração de todo o corpo em idosos com OA de joelho poderia trazer subsídios importantes para o estabelecimento de estratégias terapêuticas. Se o treinamento de vibração de todo o corpo obtiver resultados benéficos nas variáveis estudadas supracitadas, este método poderá ser uma ferramenta adicional no tratamento não-farmacológico da OA de joelho.

## 1.7 Hipóteses

Nossas hipóteses para este estudo sugerem que:

- ✓ Haverá melhora no desempenho e na capacidade físico-funcional nos parâmetros inflamatórios e neuroendócrinos após o programa de treinamento de agachamento associado à VTC em idosos com OA de joelho na fase de remissão da doença.
- ✓ Haverá presença e uma relação positiva entre as concentrações de BDNF, TNF-$\alpha$ e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) no líquido sinovial com as concentrações plasmáticas assim como com o autorrelato de dor, rigidez e função física em idosos com OA de joelho na fase inflamatória aguda da doença.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da adição da VTC ao exercício de agachamento em parâmetros inflamatórios e neuroendócrinos, relacionando-os com desempenho e a capacidade físico-funcional em idosos com OA de joelho.

## 2.2. Objetivos específicos

1. Investigar os efeitos da vibração de todo o corpo associada ao exercício de agachamento nas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e no desempenho e capacidade funcional em idosos com osteoartrite de joelho na fase de remissão da doença (Estudo 01);
2. Investigar os efeitos da adição da vibração de todo o corpo no treinamento de agachamento sobre a força muscular isométrica, na concentração plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro e na concentração salivar em repouso da razão testosterona/cortisol em idosos com osteoartrite de joelho na fase de remissão da doença (Estudo 02).
3. Investigar a relação entre as concentrações plasmáticas e o líquido sinovial de citocinas inflamatórias (TNF-$\alpha$) e receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA de joelho na fase inflamatória aguda da doença (Estudo três).
4. Investigar a relação das concentrações plasmáticas e no líquido sinovial de citocinas inflamatórias (TNF-$\alpha$) e receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) com a gravidade e o autorrelato de dor, rigidez e função física (WOMAC) em idosos com OA de joelho na fase inflamatória aguda da doença (Estudo 3).

## 3. JUSTIFICATIVA

O envelhecimento populacional é uma realidade mundial e, com ele, as doenças crônico-degenerativas são desafios cada vez mais freqüentes para os profissionais de saúde. No Brasil, a velocidade de alteração da distribuição etária é bastante elevada e isso gera a necessidade de investimento em soluções para os problemas que acometem a população idosa, como é o caso da osteoartrite.

A OA é caracterizada, principalmente, pela alteração da cartilagem hialina e do osso subcondral promovendo importantes alterações clínicas e funcionais. A articulação do joelho está entre as mais acometidas e seu tratamento consiste em ações bastante amplas, indo de intervenções medicamentosas e fisioterapia a intervenções cirúrgicas. A degradação da cartilagem articular do joelho pela OA causa um processo inflamatório devido à liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, mediadores endógenos das reações inflamatórias, responsáveis pela digestão proteolítica da cartilagem articular e outros (PENNINX et al., 2004).

A detecção e a quantificação de citocinas no líquido sinovial permite monitorar as alterações da cartilagem articular e promove o melhor entendimento da fisiopatologia da OA. Apesar do líquido sinovial ser considerado o melhor fluido para analisar os eventos ocorridos dentro da articulação (BOGAERTS et al., 2007), a análise do plasma é mais rápida, menos invasiva e mais fácil de ser utilizada em mensurações repetidas.

Sabe-se que é necessário minimizar ou reverter a progressão dessa doença e, neste aspecto, os exercícios são fundamentais, pois não estão focados somente nas consequências advindas das alterações estruturais da articulação. O tratamento da OA pode ser composto de exercícios específicos para treinamento da musculatura (força, resistência), bem como treino de propriocepção e equilíbrio.

Recentemente, o treinamento de VTC tem sido recomendado como uma eficiente alternativa para o treinamento de força muscular, propriocepção e equilíbrio (TRANS et al., 2009; VERSCHUEREN et al., 2004). A possibilidade de idosos com OA de joelho se beneficiarem com a VTC, justifica a importância de uma investigação sobre quais seriam estes possíveis benefícios, pois mesmo os idosos que não são atraídos por programas de exercícios terapêuticos convencionais ou que não são capazes de realizá-los, poderiam ter na VTC uma alternativa de tratamento.

Portanto, seria de grande valia e altamente aplicável no atendimento a estas populações, a investigação do efeito da adição de VTC em parâmetros inflamatórios, neuroendócrinos e sua associação com o desempenho e a capacidade funcional de idosos com OA de joelho.

# 4. METODOLOGIA

As realizações desses estudos obedeceram aos princípios éticos para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução 196-96 do Conselho Nacional de Saúde, recebendo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri (Anexo 01).

Para participar do estudo, os pacientes tinham que atender aos seguintes critérios de inclusão: 1) Ter idade de 60 anos ou mais; 2) Apresentar diagnóstico de OA em pelo menos um joelho – que foi baseado em critérios clínicos e radiográficos do Colégio Americano de Reumatologia (2002). A gravidade da OA de joelho foi classificada radiologicamente de acordo com a escala de Kellgren e Lawrence (1957) composta da classificação que varia de zero a quatro graus, considenrando zero como normal e quatro como OA grave. O grau dois (osteófitos definidos e possível estreitamento do espaço articular) foi usado como um ponto de corte para classificar OA do joelho (KELLGREN & LAWRENCE, 1957; SCHIPHOP et al., 2008); 3) Não apresentar enhum trauma recente no joelho; 4) Não fazer uso de qualquer dispositivo de auxílio a marcha como, por exemplo, bengalas, muletas, andadores; 5) Não ter recebido tratamento fisioterápico ou qualquer outro procedimento de reabilitação nos últimos três meses; 6) Ter presença de condições clínicas e cognitivas mínimas para a realização de atividades físicas; 7) Não ter feito uso de glicocorticóides por pelo menos dois meses antes do início do estudo. Os pacientes foram excluídos quando apresentaram: 1) Doença ortopédica; 2) Problemas cardíacos, neurológicos, ou respiratórios agudos que impedissem o desempenho dos exercícios propostos; 3) Déficit cognitivo sugerido por um escore inferior àqueles compatíveis com a sua escolaridade ao realizarem o Mini-Exame do Estado Mental (BERTOLUCCI et al., 1994); 4) Relato de distúrbios vestibulares, imunossupressão ou imunodeficiência, ou falta de controle esfincteriano (anal e/ouvesical).

Foram realizados três estudos com os respectivos objetivos: 1º.) investigar os efeitos do exercício de agachamento combinado com a vibração de todo o corpo nas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e no desempenho e capacidade funcional em idosos com osteoartrite de joelho na fase de remissão da doença; 2º.) investigar os efeitos da adição da vibração de todo o corpo ao treinamento de agachamento na força muscular isométrica na concentração plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro e na concentração salivar em repouso da razão testosterona/cortisol em idosos com osteoartrite de joelho na fase de remissão da doença; 3º.) investigar a relação entre as concentrações plasmáticas e no líquido sinovial de BDNF, TNF-α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA

de joelho, assim como a relação desses marcadores com a gravidade da OA e com o autorrelato de dor, rigidez e função física (WOMAC) em idosos com OA de joelho na fase inflamatória aguda da doença (Estudo 03).

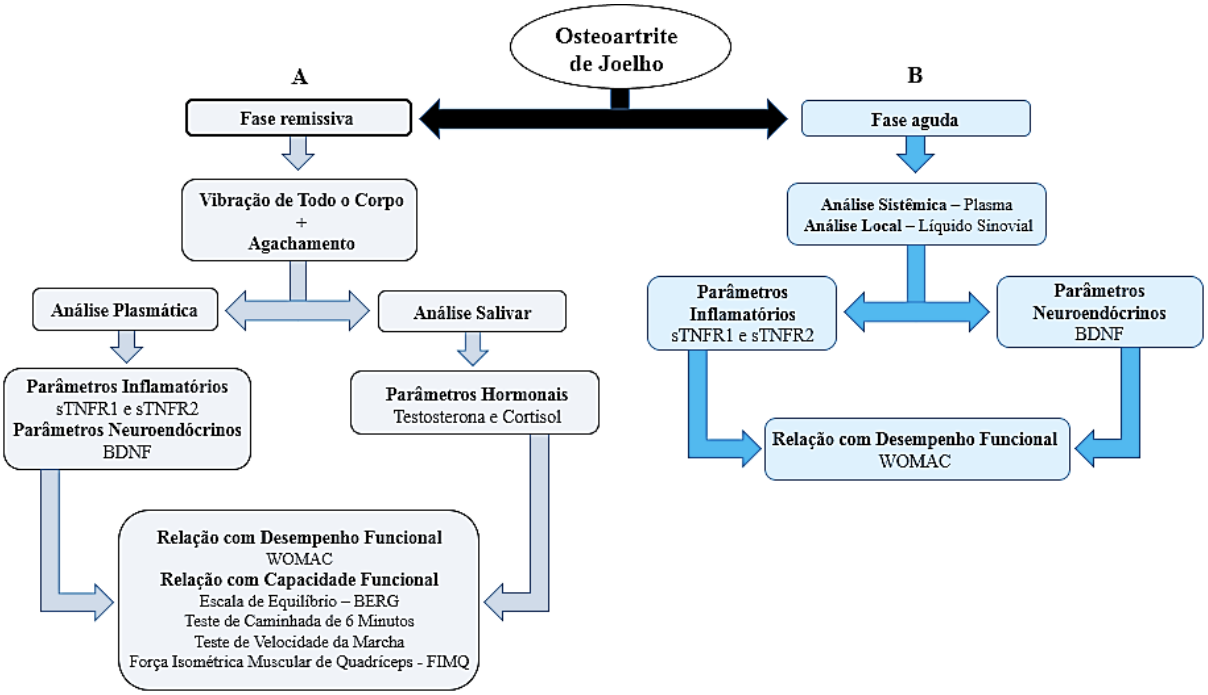



**Figura 1.** Modelo explicativo do estudo. **A**) representação dos estudos 1 e 2; **B**) representação do estudo 3.

### 4.1. Similaridades entre os estudos:

Os estudos apresentam algumas similaridades que serão destacadas a seguir:

#### 4.1.1 Aplicação dos protocolos de treinamento (Estudos 1 e 2):

Todos os indivíduos foram submetidos a um programa estruturado de exercícios de agachamento nos grupos de intervenção (grupo plataforma [GP] e grupo agachamento [GA]) realizado três vezes por semana, em dias alternados, durante doze semanas. O programa estruturado de exercício era composto por um protocolo de aquecimento em bicicleta estacionária (Stone Fitness, Huntertown, Estados Unidos) por dez minutos ininterruptos a 70% da frequência cardíaca máxima prevista para a idade e monitorada com um cardiofrequencímetro (Polar F4, Kempele, Finlândia), seguido do exercício de agachamento realizado a partir de cerca de 10º de flexão do joelho chegando até 60° de flexão do joelho (Figura 2).

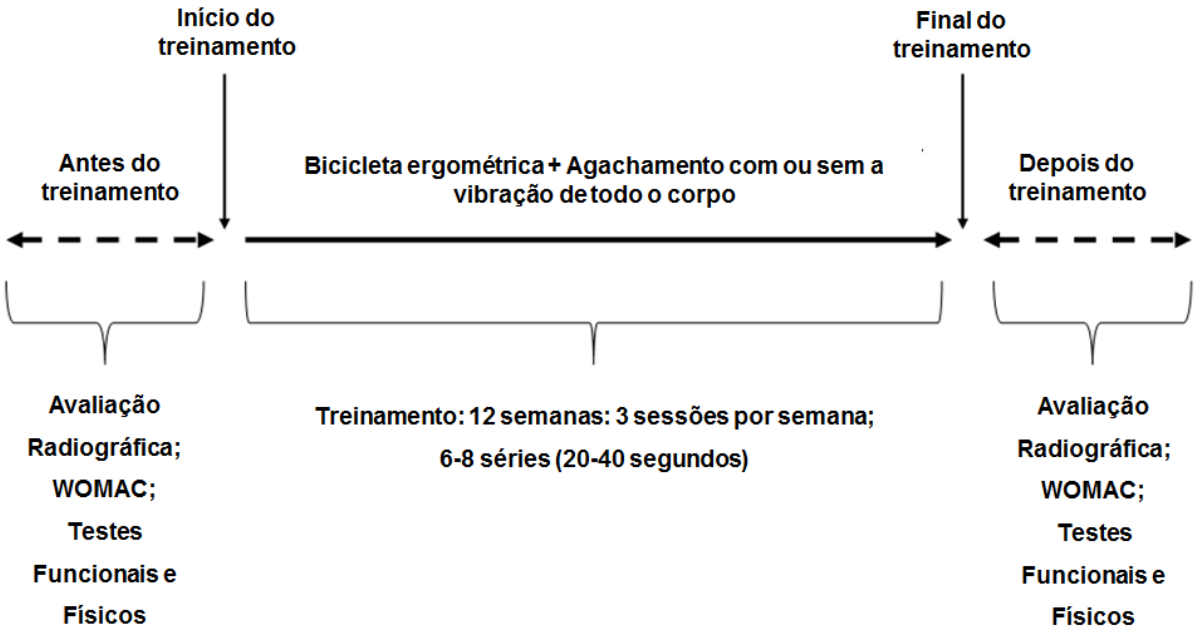



**Figura 2.** Esquema demonstrando as etapas do protocolo experimental.

Para cada voluntário, o ângulo de 60° no joelho foi medido antes da série de exercícios e uma barreira foi aplicada sob as nádegas para limitar o grau de flexão do joelho. Para controle temporal durante o agachamento, um examinador fornecia incentivo verbal e padronizado controlando o tempo de manutenção da posição de semi-agachamento (3 segundos) e da posição final do agachamento de 60º de flexão dos joelhos (3 segundos de contração isométrica) em cada repetição de agachamento. Além disso, uma distância predeterminada foi mantida entre os pés (14 cm à direita e 14 cm para a esquerda do centro da plataforma de vibração) para garantir que cada um dos membros inferiores recebessem a mesma quantidade de estímulos vibratórios. Além disso, com o objetivo de manter o controle do centro de gravidade do corpo atrás da base do suporte, o posicionamento da coluna , braços e cabeça, assim como o tipo de agachamento (simulando o movimento de sentar em uma cadeira) foram padronizados .

Os sujeitos do GP receberam uma vibração sinusoidal vertical em uma plataforma modelo comercial FitVibExcell Pró (FitVibe, GymnaUniphy NV, Bilzen, Bélgica). O modelo consiste de uma plataforma oscilatória em torno de um eixo central colocado entre os pés do indivíduo. Os parâmetros da vibração no grupo plataforma basearam-se nos princípios da progressão da carga de treinamento: a frequência variou de 35 a 40 Hz, a amplitude foi de 4 mm e a aceleração variou entre 2,78-3,26 g. A escolha de frequências vibratórias e a amplitude foram definidas de modo a se obter uma faixa de aceleração entre 2 e 5 g, a qual foi sugerida

por ser suficiente para a obtenção de efeitos fisiológicos por Delecluse et al. (2003). Antes da coleta de dados, os valores de aceleração da plataforma foram aferidos com a utilização do acelerômetro Mega (ZPP1-3D-BC The Acceleration Measuring Kit).

O volume de treinamento de agachamento para GP e GA foi aumentado sistematicamente durante as doze semanas de intervenção, por meio do aumento no tempo e no número de séries e na redução do tempo de repouso. Para os pacientes do GP, além dos incrementos previamentes citados, uma sobrecarga adicional foi fornecida pela variação da aceleração da plataforma vibratória por meio do aumento na frequência vibratória (35-40 Hz) (RAUCH et al., 2010) Tabela 1.

**Tabela 1:** Progressão do treinamento utilizando exercícios de agachamento sem (GA) e com vibração de todo o corpo (GP).

| Semanas | Parâmetros de vibração (somente para o GP) | | | Tempo/repetição de exercício de agachamento (GA e GP) | Tempo de descanso entre séries (GA e GP) |
|---|---|---|---|---|---|
| | Freqüência de vibração (Hz) | Amplitude de vibração (mm) | Aceleração (g) | | |
| 1 | 35 Hz | 4 | 2,78 | 20 segs/6 repetições | 20 segundos |
| 2 | 35 Hz | 4 | 2,78 | 20 segs/6 repetições | 20 segundos |
| 3 | 35 Hz | 4 | 2,78 | 25 segs/7 repetições | 25 segundos |
| 4 | 35 Hz | 4 | 2,78 | 30 segs/8 repetições | 25 segundos |
| 5 | 35 Hz | 4 | 2,78 | 30 segs/8 repetições | 30 segundos |
| 6 | 35 Hz | 4 | 2,78 | 40 segs/8 repetições | 30 segundos |
| 7 | 40 Hz | 4 | 3,26 | 40 segs/8 repetições | 40 segundos |
| 8 | 40 Hz | 4 | 3,26 | 40 segs/8 repetições | 40 segundos |
| 9 | 40 Hz | 4 | 3,26 | 40 segs/8 repetições | 30 segundos |
| 10 | 40 Hz | 4 | 3,26 | 40 segs/8 repetições | 30 segundos |
| 11 | 40 Hz | 4 | 3,26 | 40 segs/8 repetições | 25 segundos |
| 12 | 40 Hz | 4 | 3,26 | 40 segs/8 repetições | 25 segundos |

### 4.1.2 – Protocolo utilizado para as análises com ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) no plasma e no líquido sinovial: (Estudos 1,2 e 3)

A concentração plasmática e o líquido sinovial de BDNF, TNF-α, sTNFR1 e sTNFR2 foram medidos de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante e utilizando kits ELISA (*DuoSet, R & D System*). Seguindo protocolo padronizado, em cada poço foram adicionados 100 μL de anticorpo monoclonal contra a molécula a ser dosada, diluídos em PBS 1x, sendo incubado *over night*. Após sucessivas lavagens, as placas foram bloqueadas com 200 μL/poço de uma solução contendo PBS - BSA 1% durante duas horas a 37ºC. As amostras foram diluídas e aplicadas em um volume de 100 μL para cada poço. Paralelamente, foi

estabelecida uma curva padrão de acordo com a molécula avaliada. Os anticorpos secundários biotinilados foram diluídos em PBS – BSA 0,1% e incubados por duas horas à temperatura ambiente. Finalmente, 100 μL de estreptoavidina ligada a peroxidase na diluição de 1:4000 em PBS – BSA 0,1% foram adicionadas à placa.

O cromógeno utilizado foi o OPD (0-*phenylenediamine* – SIGMA) na diluição de 4 mg para 10 mL de tampão citrato e 2 μL/placa de $H_2O_2$ 30 volumes. A reação foi cessada adicionando-se 50 μL de $H_2SO_4$ 3M por poço. A leitura foi feita pelo leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 Nm (*SOFTmaxPro* – versão 2.2.1). O limite de detecção para estes ensaios foi de 5 pg/ml para sTNFR1, sTNFR2 e TNF-α.

## 4.2 Estudo 1: Investigar os efeitos do exercício de agachamento combinado com a vibração de todo o corpo nas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e no desempenho e na capacidade funcional em idosos com osteoartrite de joelho

### *4.2.1 Método*

Este foi um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego em que as variáveis foram avaliadas imediatamente antes e após um programa de treinamento de doze semanas. Para a alocação de participantes, uma relação de aleatoriedade 01:01 foi realizada utilizando envelopes opacos para a ocultação de alocação. Para minimizar a possibilidade de quaisquer divergências, foram utilizados envelopes opacos lacrados que foram abertos em sequência (somente após escrita do nome do participante e de mais detalhes no envelope) e mantidos em um local fechado, seguro, com número de série. Apenas o pesquisador responsável pelo sorteio tinha conhecimento das atribuições de cada grupo ao realizar a randomização.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri sob protocolo nº 001/08 (ANEXO 1).

#### *4.2.1.1 Participantes*

Foram avaliados cento e vinte e cinco pacientes idosos, e um total de trinta e cinco (quatro homens e trinta e uma mulheres) preencheram os critérios de inclusão estando aptos a participar da pesquisa. Uma vez incluídos no estudo, os voluntários foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: o grupo plataforma (GP, n= 12), que envolveu o treinamento de

exercício de agachamento associado com a vibração de todo o corpo, o grupo agachamento (GA, n= 11), que envolveu exercício de agachamento, sem vibração de todo o corpo e o grupo controle (GC, n= 12), que não recebeu treinamento e os participantes foram orientados a não mudar seu estilo de vida durante o estudo ou se envolver em qualquer novo tipo de atividade física. Para garantir a manutenção dos pacientes no grupo controle, chamadas telefônicas semanais foram feitas para cada membro do grupo para confirmar suas atividades rotineiras. A ausência de um grupo realizando somente a vibração sem associação com agachamento, justifica-se pelo desconforto causado sobre a cabeça pelo protocolo de vibração adotado por este estudo. Este desconforto é decorrente da falta de absorção do estímulo vibratório pela musculatura, principalmente, dos membros inferiores. Trinta e dois dos trinta e cinco idosos completaram o estudo e foram reavaliados após o período de treinamento de doze semanas (Figura 2).

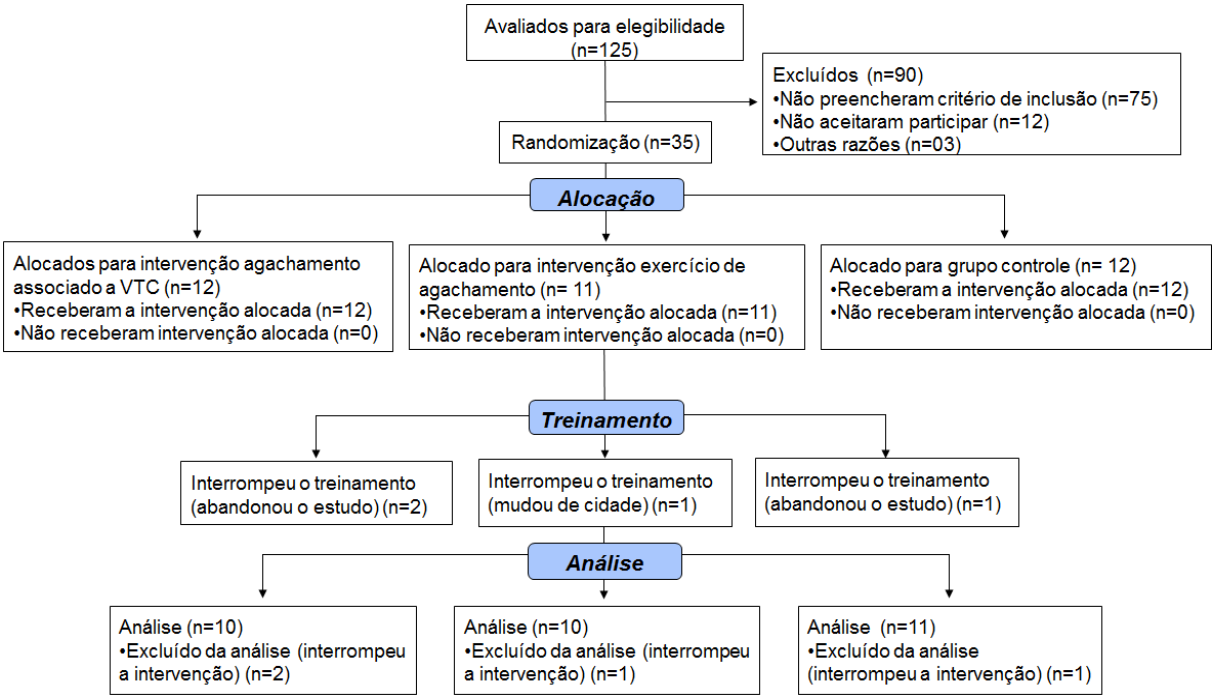



**Figura 3.** Fluxograma do estudo 1.

*4.2.1.2 Procedimentos*

Inicialmente foram coletados dados clínicos e demográficos relacionados com os participantes, e todos os pacientes do estudo (grupos plataforma, de agachamento e controle)

foram submetidos a uma coleta de sangue e a uma avaliação clínica antes do início do programa de intervenção de doze semanas. As coletas de sangue sempre foram realizadas às 08:00 da manhã seguidas da aplicação dos testes clínicos. No final do período de treinamento, os voluntários dos três grupos foram reavaliados.

Na sequência, os voluntários dos grupos de intervenção (GP e GA) foram submetidos ao protocolo de treinamento padronizado, conforme descrito anteriormente (item 4.1.1).

*4.2.1.3 Análise dos marcadores inflamatórios*

Para o processamento de plasma, as amostras de 10 mL de sangue foram coletadas da veia antecubital, usando-se técnica asséptica e heparina como anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado duas vezes a 3000 rpm durante dez minutos e o plasma foi mantido congelado a -70ºC para análise posterior. A concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2 foi medida de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante e utilizando-se kits ELISA para sTNFR1 e sTNFR2 (*DuoSet, Sistemas de R & D*), conforme procedimento descrito no item 4.1.2. O limite de detecção foi de 5 pg/mL para ambos os receptores solúveis.

*4.2.1.4 Avaliação radiográfica*

Para confirmar o diagnóstico de osteoartrite de joelho, avaliações radiográficas digitais foram realizadas em todos os participantes. Imagens oblíquas ântero-posterior e lateral de joelhos foram coletadas com indivíduos na posição ortostática com descarga de peso nos membros inferiores (HINTON *et al*., 2002). A classificação radiológica de gravidade OA, baseada na escala *Kellgren –Lawrence* (1957), foi realizada por dois examinadores que foram velados sobre o estado clínico dos participantes. Houve 100% de concordância nas avaliações de imagens radiográficas pelos examinadores.

*4.2.1.5 Avaliação do desempenho e da capacidade funcional*

Em todos os casos, os testes clínicos foram aplicados pelo mesmo examinador que desconhecia as atribuições dos participantes ao grupo. A ordem de ensaio foi sempre a mesma para os testes de funções físicas antes e depois do período de intervenção.

*Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC)*

O autorrelato do desempenho funcional foi avaliado através do WOMAC (ANEXO 2), validado para a população brasileira por Fernandes (2002). O WOMAC é composto de vinte e quatro itens e foi desenvolvido para medir o estado de saúde e avaliar a auto-percepção da dor do paciente (5 questões), rigidez articular (2 questões) e do desempenho funcional (17 questões), durante as últimas setenta de duas horas. A pontuação do WOMAC foi apresentada em uma escala do tipo *Likert* em que as questões receberam uma pontuação de 0, 25, 50, 75, ou 100 que correspondia, respectivamente, às informações: sem dor, um pouco de dor, dor moderada, dor intensa e dor muito intensa, respectivamente (BELLAMY *et al*., 1988).

*Avaliações da capacidade funcional*

Antes das avaliações de capacidade funcional, os participantes foram instruídos a usar o banheiro, a vestirem roupas e sapatos confortáveis, a beber 500 ml de água, comer uma refeição leve e evitar a atividade intensa por, pelo menos, duas horas antes dos testes.

A capacidade funcional foi avaliada com base na escala de equilíbrio de Berg (MIYAMOTO *et al*., 2004; BERG *et al*., 1992): o teste de velocidade da marcha, e o teste de caminhada de 6 minutos (STEFFEN *et al*., 2002). Todos os testes foram realizados no mesmo dia seguindo sempre a mesma ordem no pré e pós-treinamento e o questionário WOMAC foi administrado antes dos testes. Respeitou-se uma pausa de cinco minutos entre cada teste de desempenho funcional.

*A Escala de Equilíbrio de Berg*

A Escala de Equilíbrio de Berg (ANEXO 3) avalia o equilíbrio durante a realização de quatorze tarefas que envolvem o equilíbrio estático e dinâmico (isto é, alcançar, girar, transferir, permanecer em pé e levantar-se) (MIYAMOTO *et al*., 2004). O desempenho das tarefas foi avaliado por observação direta, e os escores variaram de 0 (incapaz de realizar a tarefa) a 4 (realiza a tarefa de forma independente), chegando a um máximo de cinquenta e seis pontos. Uma pontuação abaixo de quarenta e cinco indica falta de equilíbrio (MIYAMOTO *et al*., 2004; BERG *et al*., 1992).

*O teste de velocidade da marcha*

Para avaliar a velocidade da marcha, os indivíduos foram instruídos a andar em um ritmo normal ao longo de um percurso de 10 metros. Os dois primeiros e os dois últimos metros não foram contabilizados, por corresponderem aos períodos de aceleração e desaceleração. Assim, medimos o tempo necessário para completar os seis metros intermediários. O tempo médio de três execuções foi usado para calcular a velocidade de marcha em metros por segundo (m/s) (ABREU & CALDAS, 2008).

*Teste de caminhada de 6 minutos*

O objetivo do teste de caminhada de 6 minutos foi avaliar a função da marcha. Este teste mede a maior distância que o indivíduo é capaz de andar durante seis minutos. Ao ouvir um comando verbal padronizado, o indivíduo é orientado a caminhar o tão rápido quanto possível (sem correr) de uma extremidade do percurso até a outra. Depois de seis minutos, o indivíduo que está sendo avaliado é instruído a parar, e a distância percorrida é registrada. Dois testes foram realizados com um intervalo de pelo menos quinze minutos entre os ensaios (*ATS statment*, 2002; STEFFEN *et al*., 2002).

*4.2.1.6 Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 4.0 ®. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Testes não paramétricos foram utilizados para análise dos resultados. Foi realizada a análise entre os grupos através de variação (Δ) dentro de cada grupo, onde valor-pós – valor-pré= valor delta. Os dados de caracterização da amostra foram distribuídos normalmente e foram apresentados como média e o desvio-padrão.

Os marcadores inflamatórios e os dados de desempenho e da capacidade funcional não foram distribuídos normalmente e foram apresentadas como mediana e intervalo interquartílico (IQR). Para avaliar a linha de base e diferenças de valores delta entre os grupos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* com teste *post hoc* de *Dunn* para todas as variáveis. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

Tamanho da Amostra: Em um primeiro momento calculou-se o tamanho da amostra necessária no teste de velocidade de marcha que avalia a capacidade de um sujeito para

aumentar ou diminuir a sua velocidade de deslocamento acima ou abaixo de um ritmo "confortável", a qual pode variar, dependendo do meio ambiente e das exigências de tarefas como, por exemplo, cruzar ruas e evitar obstáculos) e calculou-se o tamanho da amostra que foi necessária para este teste. Considerou-se um valor de desvio padrão de 0,22 (obtido a partir do artigo de PENNINX *et al*., 2004), uma diferença mínima de 0,5 m/s entre os dois grupos, um nível de significância de 99% e um poder estatístico de 80%. Como resultado, o número mínimo de sujeitos para cada grupo de estudo necessário seria de cinco participantes. Para compensar eventuais perdas no estudo, 10% foram adicionados a este tamanho da amostra finalizando com um total de seis participantes em cada grupo.

A fórmula seguinte foi utilizada para calcular o tamanho da amostra necessário para o teste de velocidade de marcha (comparação das medidas quantitativas entre os diferentes grupos):

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

onde

Z= $\alpha$ valor crítico para evitar erro de tipo I (nível de significância de 99%) = 2,575

Zβ= valor crítico para evitar o erro tipo II (80 % de poder estatístico) = 0,84

$dp^2$= desvio padrão para a velocidade de marcha, obtido a partir de Penninx *et al*. (2004)

d= diferença mínima a ser detectada entre os grupos (0,5 m / s na velocidade da marcha).

Para os biomarcadores estudados (sTNFR1 sTNFR2), o poder estatístico do estudo foi calculado a partir dos resultados do tamanho do efeito dos deltas , obtidos a partir de comparações feitas antes e depois do treino (COHEN, 1992; COHEN, 1994). Uma comparação entre os grupos controle e plataforma demonstrou que a magnitude do efeito foi maior para os dois sTNFR1 (Cohen d = 2,19) e sTNFR2 (Cohen d = 1,37), o que indica que o estudo tem um poder estatístico acima de 84% para estas variáveis e que o tamanho mínimo da amostra para obter poder estatístico de 80% seria de sete pessoas por grupo (PORTNEY, 2008). A fórmula seguinte foi usada para calcular o efeito (COHEN, 1992):

d = (X1 - X2) / S'

onde

X1 = média do resultado do primeiro grupo;

X2 = média do resultado do segundo grupo;

S '= desvio padrão comum, o qual foi calculado a partir do desvio padrão dos dois grupos.

### 4.2.2 Resultados

As características da amostra foram apresentadas na Tabela 2. Não houve diferenças significativas entre idade, distribuição de sexo, altura, peso corporal, índice de massa corporal, ou o grau de OA entre os três grupos estudados (p>0,05), o que confirmou a homogeneidade na linha de base dos grupos. A idade média dos participantes foi de 72 anos e o índice de massa corporal (IMC) médio foi de 28,7 kg/m$^2$. A maior parte da amostra (87,5%) era do sexo feminino.

**Tabela 2**. Caracterização da amostra do estudo 1.

| Características | Grupo Controle (n= 11) | | | Grupo Agachamento (n=10) | | | Grupo Plataforma (n=10) | | | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Idade, anos | 71 (±5,3) | | | 69 (±3,7) | | | 75 (±7,4) | | | 0,063 |
| Peso, kg | 65,1 (±10,5) | | | 73,4 (±9,7) | | | 74,2 (±10,7) | | | 0,371 |
| Estatura, m | 1,56 (±0,07) | | | 1,57 (±0,08) | | | 1,56 (±0,05) | | | 0,935 |
| Índice de massa corporal, kg/m$^2$ | 26,7 (±2,74) | | | 29,8 (±2,53) | | | 27,4 (±9,7) | | | 0,456 |
| Gênero | 1(H); 10(M) | | | 1(H); 9(M) | | | 2(H); 8(M) | | | NA |
| Gravidade da OA de joelho* (%) | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | NA |
| | 46 | 27 | 27 | 50 | 10 | 40 | 20 | 30 | 50 | |

Média (± Desvio Padrão); H = Homem; M = Mulher.

*****classificado radiograficamente de acordo com os critérios de Kellgren and Lawrence[14].

Todos os participantes, de ambos os grupos de intervenção, cumpriram o programa de intervenção completo. A participação geral foi de 99,7% no grupo de plataforma e 98,6% no grupo de agachamento. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos no que diz respeito ao cumprimento do protocolo de exercícios (p>0,05).

Os valores de pré e pós-teste, a partir da avaliação físico-funcional e da concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2 são mostrados na Tabela 3. Com relação aos valores da linha de base dos três grupos, a análise estatística (teste de *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*) não apresentou diferença significativa para todas as variáveis (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores de mediana do pré-teste e do pós-teste da avaliação do desempenho, da capacidade funcional e da concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2.

| Variáveis | Grupo Controle (n=12) | | | Grupo Agachamento (n=11) | | | Grupo Plataforma (n=12) | | | Linha de base |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Pré-teste | Pós-teste | Valor de Delta | Pré-teste | Pós-teste | Valor de Delta | Pré-teste | Pós-teste | Valor de Delta | Valor de p |
| sTNFR1 (pg/ml) | **682,8 (617– 849)** | **1072,0 (879 – 1252)** | **389,2 (102 – 638)** | **722,4 (522 – 1052)** | **742,5 (373 – 1492)** | **155,0 (-720 - 536)** | **1033,0 (718 – 1281)** | **709,2 (379 – 1281)** | **-146,0 (-826 – 183)** | **0,09** |
| sTNFR2 (pg/ml) | **3568,0 (3319 – 5002)** | **4673,0 (3266 – 5371)** | **35,4 (-1206 – 2104)** | **4141,0 (3329 – 4993)** | **3650,0 (2949 – 4719)** | **-497,7 (-1351 – 2219)** | **4944,0 (3819 – 5862)** | **3987,0 (2964 – 5067)** | **-996,5 (-1750 – 147.3)** | **0,20** |
| Autorrelato de dor (Escore) | **175,0 (125 – 350)** | **175,0 (100 – 250)** | **0 (-125 – 125)** | **275,0 (150 – 350)** | **150,0 (75 – 250)** | **-62,5 (-325 – 75)** | **312,5 (238 – 400)** | **175,0 (75 – 275)** | **-137,5 (-200 – 0)** | **0,20** |
| Autorrelato de rigidez (Escore) | **75 (50 – 100)** | **75 (25,0 – 150)** | **0 (-75 – 125)** | **100 (37,5 – 125)** | **50 (0 – 137,5)** | **-25 (-100 – 50)** | **100 (75 – 137,5)** | **75 (50 – 87,5)** | **-25 (-125 – 50)** | **0,28** |
| Autorrelato de função (Escore) | **625 (525 – 675)** | **650 (450 – 950)** | **75 (-225 – 400)** | **900 (737,5 – 1213)** | **847,5 (387,5 – 1088)** | **-100 (-725 – 275)** | **975 (600 – 1325)** | **725 (350 – 1000)** | **-175 (-550 – 100)** | **0,07** |
| Escala de equilíbrio Berg (Escore) | **51,0 (50 – 55)** | **54,0 (51 – 56)** | **0 (-2 – 5)** | **53,5 (50 – 55)** | **54,5 (53 – 56)** | **1,5 (-1 – 4)** | **48,0 (45 – 55)** | **54,0 (52 – 56)** | **4,5 (0 – 14)** | **0,24** |
| Teste de caminhada (metros) | **423,5 (384 – 443)** | **430,0 (397 – 450)** | **6 (-28 – 33)** | **392,0 (361 – 454)** | **410,6 (379 – 444)** | **17,5 (-28 – 72)** | **415,7 (377 – 488)** | **438,0 (412 – 522)** | **37,5 (-18 – 78)** | **0,62** |
| Velocidade da marcha (m/s) | **1,26 (1,12 – 1,41)** | **1,33 (1,08 – 1,54)** | **0,07 (-0,14 – 0,31)** | **1,20 (1,13 – 1,47)** | **1,38 (1,24 – 1,52)** | **0,16 (-0,07 – 0,25)** | **1,10 (0,99 – 1,28)** | **1,37 (1,33 – 1,63)** | **0,33 (0,23 – 0,42)** | **0,31** |

Mediana [intervalo interquartil (IQR)]

A variação (Δ) na concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2 mostrou uma redução significativa no GP em comparação com o GC (p< 0,01 e p< 0,05, respectivamente) (Figura 4).

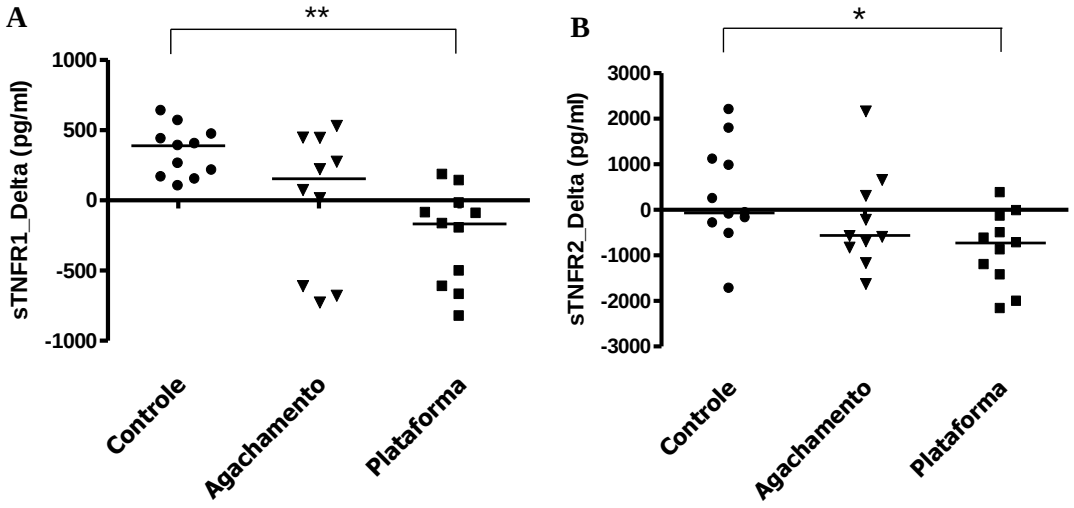
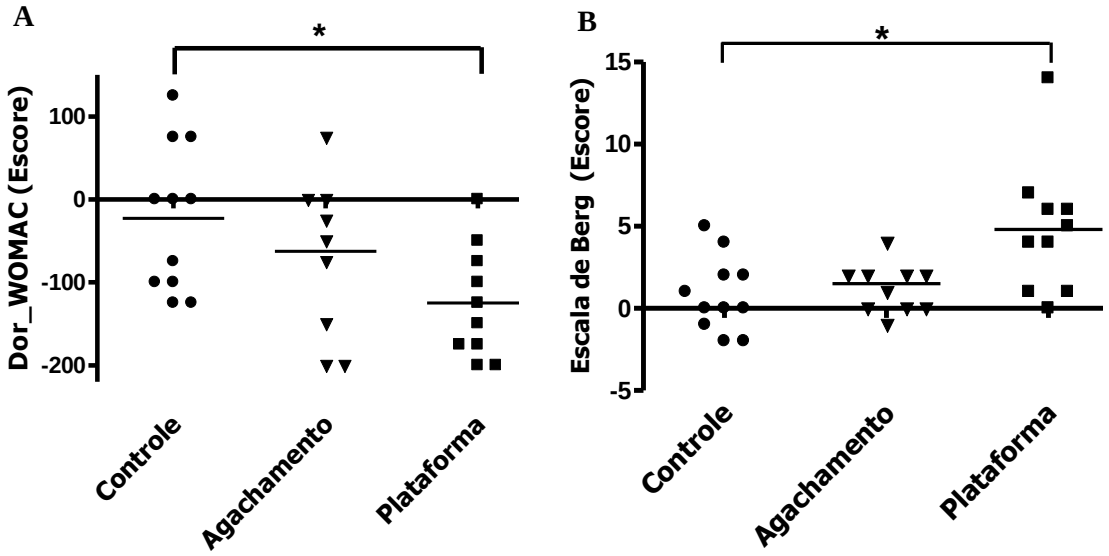



**Figura 4.** Variação na concentração plasmática de sTNFR1 (A) e sTNFR2 (B) antes e após o período de intervenção (delta = Δ). ** p<0,01 e * p<0,05 para grupo plataforma versus grupo controle.

Os dados da avaliação físico-funcional, que foram analisados por meio de resultados nas variações pós- e pré-intervenção (Δ), mostraram diferenças significativas entre GC e GP para a dor autorreferida (WOMAC: p<0,05), equilíbrio (escala de Equilíbrio de Berg: p<0,05) e capacidade funcional da marcha, que foi avaliada pela velocidade da marcha e teste de caminhada de seis minutos (p< 0,05 e p< 0,001, respectivamente). Curiosamente, a velocidade da marcha no GP foi mais rápida do que no GA (p<0,01) após treinamento (Figura 5).



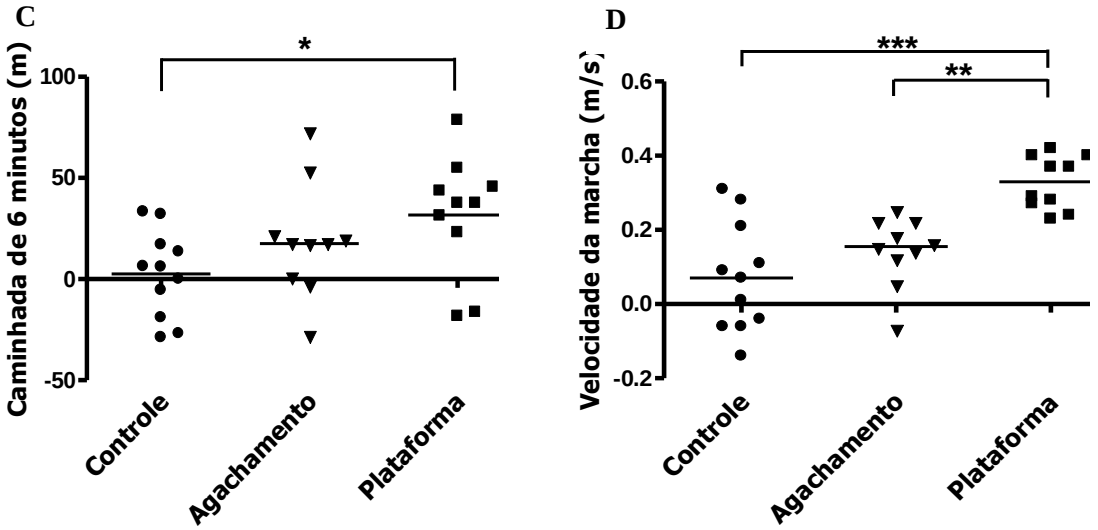



**Figura 5.** Variações do autorrelato de dor (A), equilíbrio, o qual foi avaliado pela escala de equilíbrio de Berg (B), distância percorrida no teste de caminhada de seis minutos (C) e velocidade da marcha (D) antes e após o período de intervenção (delta = Δ). * p<0,05 and *** p<0,001 para grupo plataforma versus grupo controle. ** p<0,01 grupo plataforma versus grupo agachamento.

A Tabela 4 apresenta os teste *post hoc* (valores) dos resultados da avaliação da capacidade funcional e das concentrações plasmáticas de sTNFR1 e sTNFR2.

**Tabela 4.** Teste *post hoc* (delta) da avaliação do desempenho, da capacidade funcional e da concentração plasmática de sTNFR1 e sTNFR2.

| Variáveis | Teste *post hoc* de *Dunn's* | Valor de p |
|---|---|---|
| sTNFR1 (pg/ml) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p < 0,01 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| sTNFR2 (pg/ml) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p < 0,01 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| Autorrelato da dor (Escore) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p < 0,05 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| Autorrelado da rigidez (Escore) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p > 0,05 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| Autorrelato da função (Escore) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p > 0,05 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| Escala de Berg (Escore) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p < 0,05 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| Teste de caminhada de 6 minutos (metros) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p < 0,05 |
| | Agachamento vs Plataforma | p > 0,05 |
| Teste de velocidade da marcha (m/s) | Controle vs Agachamento | p > 0,05 |
| | Controle vs Plataforma | p < 0,001 |
| | Agachamento vs Plataforma | p < 0,01 |

### 4.2.3 Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que o treinamento com a adição da VTC ao exercício de agachamento melhorou o desempenho da marcha, o equilíbrio estático e dinâmico e produziu uma diminuição dos biomarcadores e da autopercepção da dor em pacientes idosos com OA do joelho. A adição de VTC ao agachamento gera vibrações sinusoidais verticais que estimulam as terminações primárias dos fusos musculares, ativando os motoneurônios-α que resultam em contrações musculares que são comparáveis ao reflexo tônico de vibração (TRANS *et al*., 2009). Levando-se em consideração que o estímulo vibratório produz fortalecimento do membro inferior (VERSCHUEREN *et al*., 2004; ROELANTS *et al*., 2004) e melhora a propriocepção (VERSCHUEREN *et al*., 2004) em pacientes idosos com OA do joelho através da indução de contrações isométricas, concêntricas e excêntricas do quadril e músculos extensores do joelho e flexores plantares, melhorando, assim, o controle e a execução de movimentos funcionais, tais como aqueles necessários para o equilíbrio estático e dinâmico e para o desempenho da marcha, este quadro seria o responsável pela diminuição dos parâmetros inflamatórios observados no presente trabalho. Como consequência, o treinamento com VTC pode ser útil para estabilizar e/ou minimizar os sintomas e as consequências da OA de joelho em pacientes idosos, reduzindo o processo articular inflamatório e a autopercepção da dor.

O presente estudo observou que a adição de VTC ao exercício de agachamento melhorou o desempenho da marcha dos idosos avaliada pela velocidade de execução da marcha e pela distância percorrida. Embora nenhum estudo tenha investigado a distância caminhada por idosos com OA após treinamento com VTC, uma melhora na velocidade da marcha foi observada em idosos após um programa de treinamento em plataforma vibratória (KAWANABE *et al*., 2007). Além disso, alguns pesquisadores (ABREU & CALDAS, 2008; MONTERO-ODASSO *et al*., 2005) têm sugerido que a melhora do equilíbrio pode influenciar positivamente a velocidade da marcha em idoso, já que a deterioração do equilíbrio leva a um aumento do risco de quedas (MADUREIRA *et al*., 2007; AVDIC *et al*., 2006). Com isso os idosos, no intuito de compensar a sua falta de equilíbrio, aumentam a fase de duplo apoio na marcha, o que produz a diminuição da sua velocidade (MBOUROU *et al*., 2003).

Somente um estudo avaliou o efeito do treinamento com VTC no equilíbrio de idosos com OA do joelho. Neste estudo, PARK *et al*. (2013) avaliaram o efeito do treinamento de oito semanas associando a VTC a um protocolo de exercícios caseiros comparado a um grupo que realizou somente o protocolo de exercícios caseiros em mulheres idosas com OA de joelho. Tais pesquisadores observaram uma melhora significativa no equilíbrio dos dois grupos

analisados quando compararam as medidas antes e após o treinamento. Porém, a melhora obtida após o treinamento de oito semanas não diferiu entre os dois grupos. No entanto, Bautmans *et al*. (2005) utilizaram um ensaio aleatorizado controlado para investigar a viabilidade e o impacto da utilização da VTC em idosos institucionalizados e observaram uma melhora significativa no equilíbrio do grupo que realizou o treinamento na plataforma vibratória em comparação com o grupo placebo.

Uma diminuição na dor autorreferida (WOMAC) foi observada no GP em comparação com o GC sendo, este, um achado que é consistente com a literatura. De fato, estudos têm mostrado uma diminuição da dor autorrelatada imediatamente após um período de treinamento (PARK *et al*., 2013; VAN BAAR *et al*., 2001).

Acreditamos que este foi o primeiro estudo aleatório que investigou o efeito da adição da VTC ao exercício de agachamento sobre as concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios em idosos com OA do joelho. Comparadas com o GC, as concentrações plasmáticas dos receptores solúveis de TNF-α (sTNFRs) no grupo de plataforma foram reduzidas, o que coincidiu com uma melhora no equilíbrio estático e dinâmico no desempenho da marcha e na dor autorrelatada.

O TNF-α é uma citocina potente que é predominantemente pró-inflamatória e catabólica. Interessantemente, o TNF-α, o qual é produzido principalmente por fagócitos estimuladas (ADERKA *et al*., 1992), está envolvido na iniciação e progressão da OA (GOEKOOP *et al*., 2010; GOLDRING & GOLDRING, 2004). Os sinais intracelulares para a resposta ao TNF-α são mediados por duas espécies distintas de receptores na superfície celular (isto é, receptores de superfície para TNF-α [TNFR1] e [TNFR2]) que se ligam ao TNF-α com alta afinidade. TNFR1 é expresso pela maioria dos tipos de células, ao passo que TNFR2 é primariamente expresso por células hematopoiéticas e células endoteliais (WAETZIG *et al*., 2005). Ambos os receptores para TNF-α também existem em formas solúveis (ou seja, sTNFR1 e sTNFR2). Curiosamente, a clivagem dos receptores do TNF-α na superfície da célula pela enzima conversora de TNF-α resulta em níveis séricos apreciáveis de sTNFR1 e sTNFR2. Estes sTNFRs podem competir com os receptores da superfície celular se ligando ao TNF-α solúvel e, assim, bloqueando sua atividade (GOKHALE *et al*., 2007; WAETZIG *et al*., 2005). É importante salientar que o TNF-α é uma citocina pró-inflamatória que é muito sensível a alterações sutis nos níveis de glicocorticóides endógenos tais como variações circadianas. Além disso, ele tem uma meia-vida relativamente curta. De acordo com Kaneyama *et al.* (2010) e Cope *et al.* (1992), a expressão de sTNFR1 e sTNFR2 reflete as alterações na atividade catabólica de TNF-α na matriz cartilaginosa. Além disso, há evidências científicas de que os

estímulos que aumentam as concentrações de citocinas podem, também, induzir aumentos na produção de receptores solúveis e, dessa forma, diminuir a atividade da respectiva citocina (PENNINX *et al*., 2004). Considerando que os receptores solúveis são geralmente mais estáveis na circulação do que as citocinas, eles podem ser marcadores mais confiáveis de inflamação crônica. Dada esta possibilidade, foi levantada a hipótese de que a redução significativa das concentrações plasmáticas de ambos sTNFR1 e sTNFR2 no GP em comparação com o GC poderia resultar em uma redução no processo inflamatório da articulação do joelho.

Penninx *et al*., (2004) investigaram a associação entre as concentrações séricas de marcadores solúveis (interleucina-6 [IL-6], proteína C reactiva, TNF-α) e dos receptores solúveis (receptores solúveis de IL-6 e IL-2, sTNFR1, sTNFR2) à capacidade funcional e à gravidade da doença em idosos obesos com OA do joelho. Os resultados do estudo de Penninx *et al*. (2004) mostraram que, particularmente, o nível elevado de sTNFR1 e sTNFR2 foram associados com diminuição na função física, aumento dos sintomas de OA e pior escore nas radiografias do joelho.

Não houve diferenças significativas entre o GA e o GC, mesmo nas concentrações plasmáticas de sTNFR1 e sTNFR2. Acredita-se que a própria sobrecarga de massa corporal dos sujeitos durante o treinamento com exercícios de agachamento não foi suficiente para promover melhoras nos testes de avaliação físico funcional utilizados no presente estudo ou alterar as concentrações plasmáticas de sTNFR1 e sTNFR2 ou a auto-percepção da dor. Curiosamente, em comparação com os controles, a associação de VTC com agachamento foi suficiente para induzir alterações significativas, o que sugere que o estímulo vibratório proporcionou uma sobrecarga adicional ao exercício de agachamento. Além disso, a comparação entre os três grupos mostrou uma tendência para a melhora no GP em comparação com o GA em todas as variáveis analisadas. Este achado foi confirmado pelas diferenças significativas observadas entre o GP e GA no teste de velocidade da marcha.

*Limitações deste estudo*

A adição de VTC ao exercício de agachamento foi projetada para fortalecer os membros inferiores (ROELANTS *et al*., 2004; TRANS *et al*., 2009) em pacientes idosos com OA através da indução de contrações isométricas, concêntricas e excêntricas do quadril e grupos musculares extensores do joelho e flexores plantares. Uma limitação dos resultados aqui apresentados é que eles não podem ser extrapolados para outras modalidades de atividade física.

Outros estudos são necessários para avaliar as alterações no sTNFRs em outras modalidades de exercícios.

### 4.2.4 Principais achados

- A associação de VTC ao exercício de agachamento promoveu melhora em todas as variáveis estudadas quando comparado ao grupo controle;
- Não houve diferença significativa entre o grupo agachamento e o grupo controle nas variáveis estudadas;
- Sugere-se que o estímulo oferecido pela VTC promoveu uma sobrecarga adicional ao exercício de agachamento, suficiente para promover uma melhora do quadro inflamatório e funcional em idosos com OA de joelho.

## 4.3 Estudo 2 - Investigar os efeitos da adição da vibração de todo o corpo ao treinamento de agachamento sobre a força muscular isométrica, na concentração plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro e na concentração salivar em repouso da razão testosterona/cortisol em idosos com osteoartrite de joelho

### *4.3.1 Método*

Este é um ensaio clínico randomizado, no qual as variáveis foram avaliadas vinte e quatro horas antes e vinte e quatro horas após um programa de treinamento de doze semanas. Para a alocação de participantes, uma randomização de relação 01:01 foi realizada utilizando envelopes opacos para alocação sigilosa. Para minimizar a possibilidade de vieses, foram utilizados os seguintes métodos: a) envelopes opacos, lacrados e com número de série, b) os envelopes foram abertos sequencialmente após o nome do participante e detalhes foram escritos no envelope e, c) os envelopes eram mantidos em um lugar fechado e seguro. A sequência de alocação foi duplovelada (tanto para os pesquisadores responsáveis pelo treinamento quanto para os pesquisadores responsáveis pela avaliação dos participantes). Apenas o pesquisador que realizou a aleatorização tinha conhecimento sobre o tipo de tratamento que cada voluntário realizaria. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri sob protocolo nº 001/08 (ANEXO 1).

*4.3.1.1 Participantes*

Os voluntários foram recrutados a partir da lista de espera da Clínica de Fisioterapia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e por meio de encaminhamento médico. Para participar do estudo, os voluntários eram obrigados a atender aos seguintes critérios de inclusão: 1) Deviam ser mulheres com mais de sessenta anos de idade que não estivessem em uso de terapia de reposição hormonal e com diagnóstico de OA em pelo menos um joelho, de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (HINTON *et al*., 2002). A gravidade da OA do joelho foi classificada, radiograficamente, de acordo com os critérios de *Kellgren* e *Lawrence* (1957) [0-4 graus, sendo zero classificado como normal e quatro representando a OA grave]. A classificação Grau dois [osteófitos definidos e possível estreitamento do espaço articular] foi usado como um ponto de corte para determinar o OA do joelho (HINTON *et al*., 2002); 2) Não apresentar nenhuma lesão recente no joelho; 3) não necessitar de auxílio à marcha, e não ter passado por nenhum procedimento de reabilitação nos últimos três meses. Os voluntários seriam excluídos caso apresentassem qualquer doença ortopédica, neurológica, respiratória ou cardíaca aguda ou algum déficit cognitivo, conforme determinado pelo Mini Exame do Estado Mental (BRUCKI *et al*., 2003).

Dos cento e vinte e cinco idosos selecionados para a elegibilidade, somente quinze mulheres idosas preencheram todos os critérios, tiveram a amostra de saliva e sangue coletadas em repouso (8:00 horas) e, em seguida, participaram do teste de contração isométrica voluntária máxima (CIVM). Posteriormente, as idosas foram distribuídas em dois grupos: 1) o grupo vibração, no qual as idosas realizaram treinamento com exercício de agachamento em associação com a VTC (GP, n = 7); ou 2) o grupo de agachamento, no qual as idosas realizaram treinamento com exercícios de agachamento, sem vibrações (GA, n = 8; Figura 6).

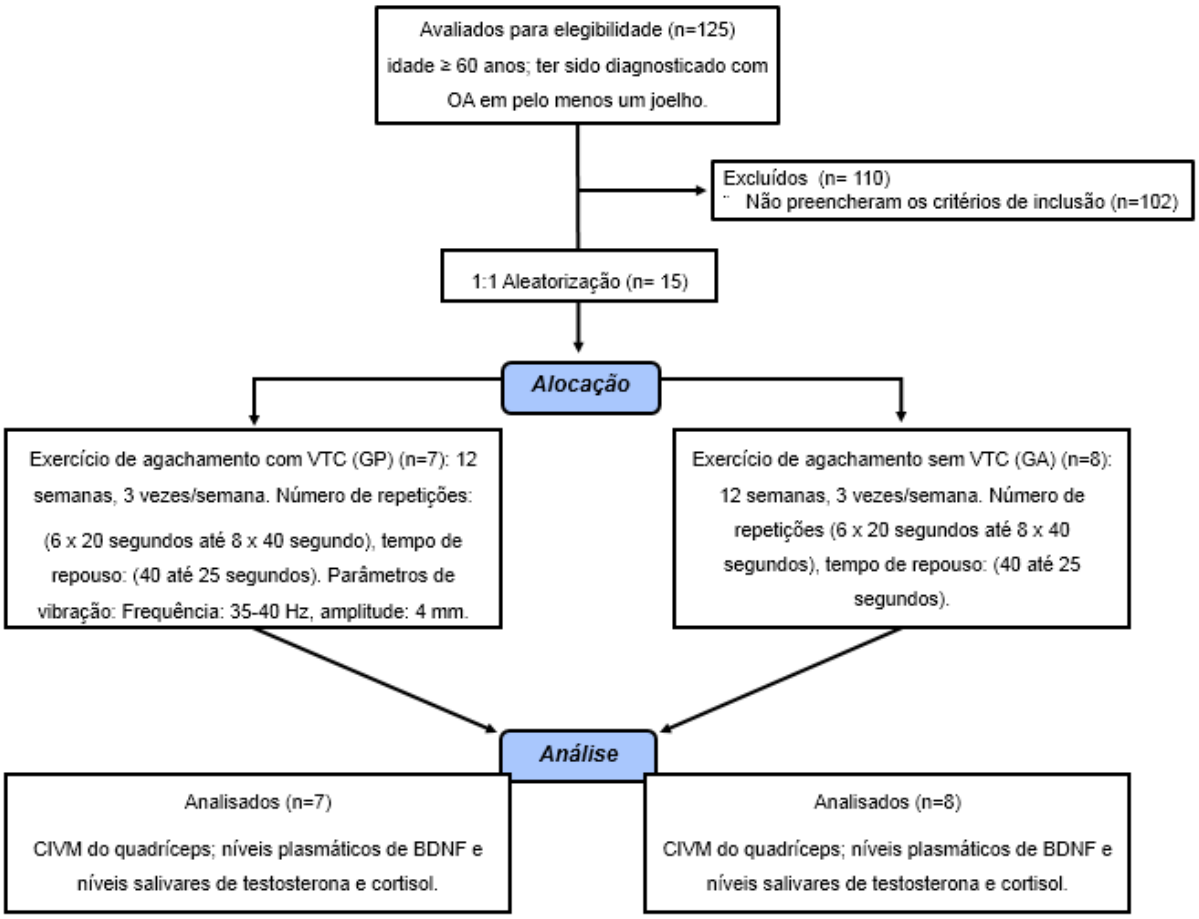



**Figura 6.** Fluxograma do estudo 2.

### *4.3.1.2 Procedimentos*

Os dados clínicos e demográficos foram coletados de todas as idosas participantes em uma ficha de avaliação. Antes do início do programa de treinamento de doze semanas, uma amostra de saliva das idosas de todos os grupos foi coletada às 08:00 seguido da avaliação da CIVM do músculo quadríceps. Após vinte e quatro horas do período de intervenção, os voluntários de ambos os grupos foram reavaliados. Estes procedimentos foram realizados a fim de evitar quaisquer efeitos do ritmo circadiano sobre o estado hormonal e a realização de CIVM do músculo quadríceps. Os testes foram realizados por um examinador experiente que desconhecia a alocação grupo.

O programa de intervenção consistiu em realizar o treinamento com exercícios de agachamento com (GP) ou sem (GA) vibração de todo o corpo, três vezes por semana em dias alternados conforme descrito na seção 4.1.1.

*4.3.1.3 Avaliação da força isométrica do músculo quadríceps (FIMQ)*

As FIMQ foram avaliadas pela CIVM dos extensores do joelho, medidas com o auxílio da célula de carga de acordo com Neves *et al*. (2011). Para esta avaliação, o voluntário foi posicionado na cadeira de flexo-extensão (*Home Sport, Master Top model*) e assumiu uma postura sentada com um tronco reto e os quadris flexionados em 90º. O membro a ser testado foi posicionado a 60° de flexão do joelho (avaliadas individualmente por goniometria do joelho) e a alavanca de resistência foi posicionada sobre o terço distal da perna.

A célula de carga (*Miotec* - Equipamentos Biomédica) foi devidamente calibrada e posicionada entre a roldana e o ponto de fixação do cabo de aço, perpendicular ao chão, para aquisição do sinal durante os testes de CIVM. A célula de carga foi ligada ao *Miotool software 400* que transmitiu os valores da força muscular isométrica produzida para um computador. O teste de CIVM foi realizado durante 6 segundos, com 1 minuto de repouso entre as repetições e com o total de três repetições por perna.

Antes do ensaio, as idosas realizavam um aquecimento de 10 minutos em uma bicicleta estacionária (*Stone Fitness, Huntertown,* Estados Unidos), sendo estimuladas a atingir 70% da frequência cardíaca máxima prevista para a idade, medida com a utilização do monitor cardíaco polar (modelo F4). Este procedimento foi realizado para reduzir o risco de lesões durante o teste (BROWN & WEIR, 2003).

O coeficiente de correlação intra-classe (ICC) para FIMQ foi de 0,98 (95% CI: 0,94-0,99).

*4.3.1.4 Análise dos níveis plasmáticos de BDNF*

Para o processamento de plasma, 10ml de sangue periférico foram coletados da veia antecubital usando-se técnicas assépticas e heparina como anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado duas vezes a 3000 rpm durante dez minutos e o plasma foi mantido congelado a -70ºC até ser analizado. Os níveis plasmáticos de BDNF foram medidos usando kits de ELISA específicos para o BDNF (*BDNF DuoSet, R&D Systems*). Conforme protocolo descrito no item 4.1.2. O limite de detecção para BDNF foi de 10 pg/mL.

*4.3.1.5 Coleta salivar e análise hormonal*

Para determinar as concentrações hormonais salivares e determinar a taxa de concentração de testosterona/cortisol, as idosas foram instruídas a evitar a ingestão de alimentos, o consumo de líquidos quentes, ou escovar os dentes por duas horas antes da avaliação. As idosas foram instruídas a manter a sua dieta normal nos dias de teste (ROMMERTS, 1998). As idosas foram convidadas a permanecer sentadas na ante-sala do laboratório por um período de vinte minutos antes da coleta de saliva.

A saliva das idosas foi coletada usando *Salivette*® (*Sarstedt, Numbrecht,* Alemanha). As amostras foram imediatamente armazenadas numa geladeira ou em uma caixa térmica refrigerada antes do armazenamento no laboratório, onde foram mantidos à temperatura de -20°C. As amostras foram descongeladas e centrifugadas pelo menos uma vez para permitir a precipitação de mucinas antes das análises das concentrações salivares de cortisol e de testosterona utilizando kits de imunoensaios enzimáticos (*Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, EUA e Salimetrics LLC, State College,* EUA). As sensibilidades analíticas foram 0,011 µg/dl e 1,0 pg/ml, respectivamente, e os coeficientes de variação (inter-e intra-ensaio) foram <10%.

Optou-se pela avaliação dos níveis hormonais na saliva porque a concentração de hormônios na saliva é proporcional aos níveis plasmáticos. Além disso, qualquer estressor sinal aferente tais como a retirada do sangue poderia modificar os níveis de secreção hormonal. Além disso, a forma livre do hormônio é a forma ativa. Somente a forma livre, forma não ligada dos esteróides, pode entrar na saliva, e a concentração de testosterona livre na saliva é proporcional à do sangue (ROMMERTS, 1998).

*4.3.1.7 Análise Estatística*

O programa de software estatístico SPSS (*IBM, Chicago, IL, EUA*), versão 18.0 foi utilizado para as análises estatísticas. Os valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi realizada análise entre grupos pela variação (Δ) dentro de cada grupo, em que o valor pós - valor pré = valor Delta (Δ). O teste de *Shapiro-Wilk* foi usado para avaliar a normalidade dos dados [valor de Delta (Δ)]. Como os dados apresentaram distribuição normal para as variáveis dependentes, os testes paramétricos foram utilizados nas análises estatísticas. Os valores delta para o grupo GP e GA foram comparados por meio do teste t não-pareado. Para verificar o tamanho das diferenças entre os períodos pré e pós-treinamento e entre os grupos, foi calculado o tamanho do efeito (COHEN, 1992). A magnitude do efeito de análise é

uma medida adicional para o teste estatístico tradicional da hipótese nula e destina-se a verificar o significado clínico do efeito encontrado e não está limitada a dicotomia [significativa ou não significativa] dos resultados (FERREIRA *et al*., 2008). Assim, com a análise de magnitude do efeito, é possível identificar se as diferenças observadas são pequenas, médias ou grandes.

Tamanho da Amostra: A testosterona é o principal androgênio circulante no corpo humano (ERSKINE *et al*., 2007), e contribui para os processos de hipertrofia muscular e crescimento do osso, ela está relacionada com um aumento na força muscular. Portanto, a testosterona foi selecionada como a "variável desfecho" do presente estudo. Devido a isso, o cálculo do tamanho da amostra foi realizado considerando essa variável.

Apenas um estudo foi realizado para verificar as respostas hormonais a uma única sessão de exercício de VTC em idosos, desta forma, o estudo supracitado foi utilizado como referência para o nosso cálculo do tamanho da amostra, tendo em vista algumas semelhanças entre as variáveis dependentes e as características da amostra (ENEA *et al*., 2011). Portanto, como a diferença detectada entre os grupos no estudo de Cardinale *et al*. (2010) foi mais elevada que 150 pmol/L e o desvio padrão foi de 100 pmol*L $^{-1}$, definimos a diferença mínima significativa a ser detectada entre os grupos como 150 pmol/L. Diante disso, com a definição da diferença mínima significativa a ser detectada entre os grupos sendo de 150 pmol/L, com um nível de significância de 95% e um poder estatístico de 80%, como resultado, obteve-se que, pelo menos, sete participantes seriam exigidos em cada grupo. A fórmula utilizada para calcular o tamanho da amostra foi de [comparação de medidas quantitativas entre os diferentes grupos] (JEKEL *et al*., 2001):

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

Onde:

n: tamanho da amostra;

**Zα e Zβ**: valores da função de distribuição cumulativa de uma distribuição normal padrão, associada com a probabilidade de erros de tipo I (α) e erros do tipo II (β) em testes bilaterais das hipóteses;

**dp**: desvio padrão da variável importante de desfecho do estudo, obtido a partir da literatura, e

**d**: a diferença mínima detectada na variável desfecho, entre os grupos definidos pelo investigador ou obtido a partir da literatura.

### 4.3.2 Resultados

Todas as idosas de ambos os grupos cumpriram completamente o programa de intervenção. A participação geral foi de 99,7% no grupo de GP e 98,6% no grupo GA. Não houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito ao cumprimento do protocolo de exercícios (p = 0,41). Nenhum efeito adverso foi relatado pelos indivíduos.

Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à média de idade (68 ± 7,17 GP vs 72 ± 4,07 GA), massa corporal (72,57 ± 12,77 GP vs 75,45 ± 10,53 GA), altura (1,55 ± 0,05 GP vs 1,57 ± 0,09 GA) ou a gravidade da OA do joelho [Classificada radiograficamente de acordo com a escala de *Kellgren e Lawrence* (1957) – GP: grau 2 (50%), 3 (10%), 4 (40%) e GA: grau 2 (20%), 3 (30%), 4 (50%)]. (Tabela 1)

**Tabela 5:** Caracterização da amostra do grupo vibração (GP) e grupo agachamento (GA). Dados apresentados em média (SD). p< 0,05.

| Características | GP (N: 7) | | | GA (N: 8) | | | Tamanho do Efeito | Valor de t (95%CI) | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Idade (anos) | 71 (7) | | | 70 (4) | | | 0,18 | 0,75 (-4,16 – 8,62) | 0,46 |
| Peso (kg) | 72,57 (12,77) | | | 75,45 (10,53) | | | -0,25 | 0,48 (-36,15 – 13,25) | 0,64 |
| Estatura (metros) | 1,55 (0,05) | | | 1,57 (0,09) | | | -0,27 | 0,60 (-0,11 – 0,06) | 0,56 |
| Gravidade da OA de joelho* (%) | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | — | — | — |
| | 50 | 10 | 40 | 20 | 30 | 50 | | | |

* Classificado radiograficamente de acordo com os critérios de Kellgren and Lawrence.

Não foram encontradas diferenças significativas nos dados coletados antes do treino entre os grupos. Apesar de não ser estatisticamente significativa, a diferença entre os grupos de força muscular, BDNF e testosterona no início do estudo é bastante substancial, com o valor de *Cohen* de *d*= -0.97, -0.87, e 1,04, respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6.** Variáveis (antes e após treinamento) do grupo vibração (GP) e grupo agachamento (GA). Dados apresentados em média (SD). p< 0,05.

| Variáveis | GP (N: 7) | GA (N: 8) | Tamanho do Efeito | Valor de t (95%CI) | Valor de p |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Antes do Treinamento*** | | | | | |
| Força Muscular (Kgf) | 21,89 (2,57) | 25,25 (4,18) | -0,97 | -1,84 (-7,31 – 0,59) | 0,09 |
| Concentração plasmática de BDNF (pg/mL) | 3365 (1751) | 4998 (1989) | -0,87 | -1,68 (-3738 – 472) | 0,12 |
| Testosterone salivar (pg/mL) | 144,7 (48,10) | 107,5 (15,68) | 1,04 | 1,93 (-7,76 – 82,31) | 0,09 |
| Cortisol salivar (pg/mL) | 0,21 (0,14) | 0,22 (0,13) | -0,07 | - 0,02 (-0,17 – 0,17) | 0,98 |
| Razão da concentração Testosterona/Cortisol (pg/mL) | 1062 (835) | 599,3 (256,1) | 0,75 | 1,39 (-317,3 – 1,24) | 0,21 |
| ***Após Treinamento*** | | | | | |
| Força Muscular (Kgf) | 24,06 (2,6) | 23,60 (5,9) | 0,10 | 0,20 (-4,66 – 5,60) | 0,84 |
| Concentração plasmática de BDNF (pg/mL) | 3630 (948,1) | 3013 (632,9) | 0,77 | 1,50 (-557,7 – 1506) | 0,16 |
| Testosterone salivar (pg/mL) | 77,79 (36,23) | 101,6 (18,55) | -0,83 | -1,52 (-59,07 – 11,49) | 0,16 |
| Cortisol salivar (pg/mL) | 0,17 (0,12) | 0,26 (0,17) | -0,61 | -1,02 (-0,27 – 0,10) | 0,34 |
| Razão da concentração Testosterona/Cortisol (pg/mL) | 1579 (2252) | 580,5 (339) | 0,62 | 1,16 (-1,09 – 3,08) | 0,29 |
| ***Valores de Delta*** | | | | | |
| Força Muscular (Kgf) | 2,17 (2,39) | -1,66 (3,29) | 1,33 | 2,55 (0,58 – 7,08) | 0,02* |
| Concentração plasmática de BDNF (pg/mL) | 264,9 (1804) | -1985 (1842) | 1,23 | 2,38 (210 – 4289) | 0,03* |
| Razão da concentração Testosterona/Cortisol (pg/mL) | 636,2 (856,8) | 1115 (2,21) | -0,79 | -0,53 (-2,46 – 1,50) | 0,61 |

Para controlar as possíveis diferenças entre os grupos na linha de base, a CIVM do músculo quadríceps, a concentração plasmática de BDNF e a concentração salivar da relação entre testosterona/cortisol foram realizadas considerando-se os valores de deltas (resultado da subtração entre o valor do pós-treino – valor do pré-treino) para cada grupo, conforme indicado por Δ.

Os dados da FIMQ mostraram um aumento significativo no grupo de GP comparado com o grupo GA (FIMQ, p = 0,02; tamanho do efeito = 1,33; Figura 7.A) (Tabela 5). Após o período de intervenção, em comparação com o início do estudo, a FIMQ aumentou, em média, 2,17 Kgf no GP e diminuiu, em média, 1,66 Kgf, no GA (Figura 7.A).

A variação da concentração plasmática de BDNF (Δ) demonstrou um aumento significativo no GP comparado com o GA (Tabela 5) (BDNF, p = 0,03; tamanho do efeito = 1,23; Figura 7.B).

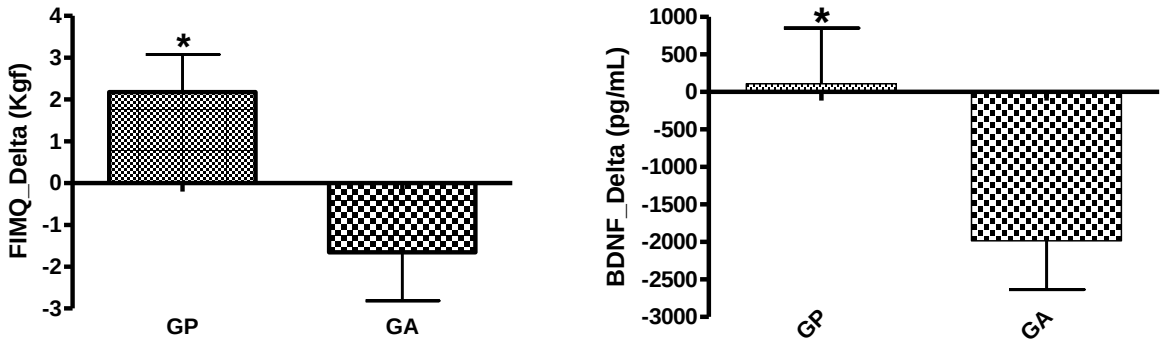



**Figura 7. (A)** A variação da força isométrica do músculo quadriceps (FIMQ) antes e após o período de intervenção (delta = Δ) no grupo vibração (GP) e grupo agachamento (GA). Os dados são apresentados como média e desvio padão. *GP apresenta diferença significativa de GA, p≤0,05. **(B)** A variação na concentração plasmática de BDNF antes e após o período de intervenção (delta = Δ) no grupo vibração (GP) e no grupo agachamento (GA). Os dados são apresentados como média e desvio padão. *GP apresenta diferença significativa de GA, p≤0,05.

Foi encontrada uma alta correlação positiva entre a FIMQ e BDNF (Spearman r = 0,67 e p =0,007, Figura 8)

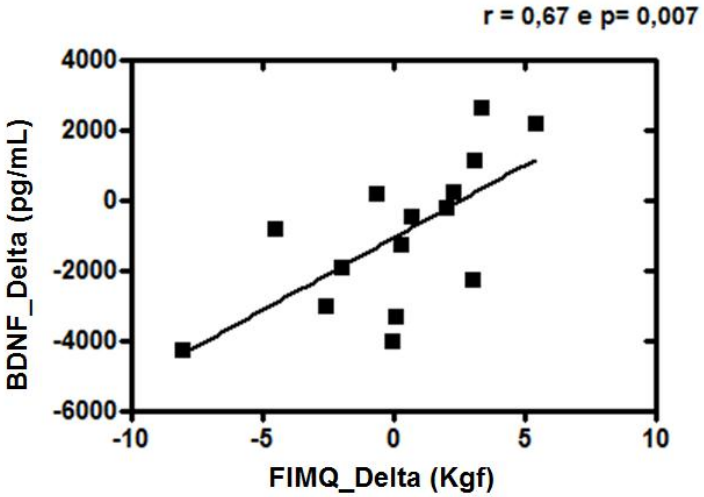



**Figura 8.** Diagrama de dispersão mostrando a correlação positiva entre os valores de delta (Δ) da força isométrica do músculo quadríceps (FIMQ) e a concentração plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em mulheres idosas com osteoartrite (OA) do joelho.

No que diz respeito aos níveis hormonais, não houve diferença entre os grupos na relação entre a concentração salivar de testosterona/cortisol (Δ) (razão T/C, p = 0,61; tamanho do efeito = -0,79; Figura 9) (Tabela 6).

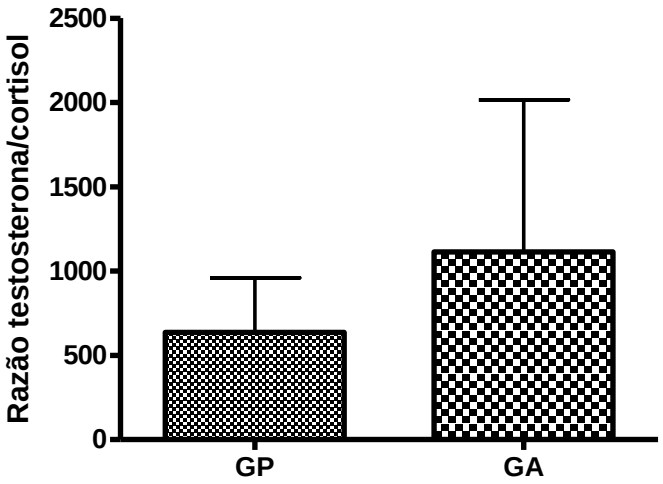



**Figura 9.** A alteração dos razões testosterona/cortisol [níveis basais, antes e após o período de intervenção (delta = Δ)] no grupo de vibração (GP) e o grupo de agachamento (GA). Os dados são apresentados como média e desvio padrão. * GP é significativamente diferente de GA, $p \leq 0,05$.

### 4.3.3 Discussão

Este foi o primeiro estudo randomizado desenhado para determinar se a adição de VTC ao treinamento com exercício de agachamento poderia melhorar a FIMQ, afetar a concentração plasmática BDNF e a relação hormonal testosterona/cortisol salivar em mulheres idosas com OA do joelho. Os resultados deste estudo demonstram que a adição de VTC ao treino com agachamento melhorou os valores da FIMQ e aumentou as concentrações plasmáticas de BDNF sem produzir alteração na relação hormonal testosterona/cortisol salivar na população estudada.

O aumento observado da FIMQ quando associa-se o treino VTC ao exercício de agachamento em idosos é consistente com relatos na literatura (REES *et al*., 2008; LAU *et al*., 2011). O efeito crônico do treinamento com a VTC na FIMQ está de acordo com a hipótese de que o reflexo tônico de vibração afeta principalmente a capacidade do sujeito de gerar altas taxas de disparo de unidades motoras de contração rápida (ROELANTS *et al*., 2004). Além disso, sugere-se que os limites de recrutamento das unidades motoras durante a VTC é menor que com as contrações voluntárias, provavelmente resultante de uma ativação mais rápida e ativação de unidades motoras de alto limiar (ROELANTS *et al*., 2004).

No entanto, é importante mencionar que os estudos citados acima (LAU *et al*., 2011; REES *et al*., 2008; ROELANTS *et al*., 2004) foram realizadas com idosos sem história de OA do joelho. OA do joelho parece levar a uma redução significativa na força do quadríceps e, consequentemente, na capacidade de andar, subir escadas e se levantar de uma cadeira, especialmente em pessoas idosas, fato que justifica a importância de se estudar o efeito da adição da VTC ao exercício de agachamento em idosos com OA do joelho.

Até o momento, existem apenas dois estudos na literatura que investigaram e demonstraram a eficácia do treinamento com VTC na força muscular do quadríceps em indivíduos com OA do joelho comparado com o grupo controle [sem a intervenção] (PARK *et al.*, 2013; TRANS *et al*., 2009). No estudo de Park *et al.* (2013) foi avaliado o efeito do treinamento de oito semanas associando a VTC a um protocolo de exercícios domiciliares comparado ao grupo que realizou somente o protocolo de exercícios domiciliares em mulheres idosas com OA de joelho. Neste estudo foi observada uma melhora significativa na força muscular do quadríceps dos dois grupos analisados quando comparadas às medidas antes e após o treinamento, porém, a melhora obtida após o treinamento de oito semanas não diferiu entre os dois grupos. Talvez a diferença entre nossos resultados quando comparada aos resultados obtidos por Park *et al*. (2013) possa estar relacionada ao período de treinamento, que no nosso estudo foi composto pelo período de doze semanas, e também à padronização e controle

supervisionado da execução do exercício proposto. No entanto, nossos resultados estão em concordância com o estudo de Trans *et al.* (2009). Porém, destacam-se algumas diferenças entre os dois estudos: No estudo de Trans *et al*. (2009), o grupo de intervenção foi submetido apenas ao treinamento com VTC e o grupo controle não participou de qualquer tipo de intervenção. No entanto, no nosso estudo, os efeitos da adição de vibração de todo o corpo ao exercício de agachamento foi comparado com um grupo realizando somente o exercício de agachamento e demonstrou a eficiência da associação da VTC ao agachamento. Além disso, no nosso estudo, houve padronização do ângulo de flexão do joelho enquanto no estudo da Trans *et al.* (2009) os participantes flexionavam seus joelhos até a posição livre de dor.

Destacamos ainda que o aumento da força do músculo quadríceps observado neste estudo para o grupo GP tem um forte impacto clínico pois, tal como a literatura indica, a alteração mínima detectável na força muscular isométrica do quadríceps é de 2,25 N/m (KEAN *et al.*, 2010). Considerando que 1 kgf corresponde a 9,81 N/m, o aumento observado de 2,17 kgf na FIMQ no grupo GP corresponde a 21,29 N/m (um valor nove vezes maior do que o valor mínimo detectável).

Existem duas possíveis explicações para o resultado que obtivemos em que a adição de VTC ao treinamento com exercício de agachamento promove melhora na força do quadríceps em mulheres idosas com OA do joelho. A primeira hipótese sugere que o treino de VTC associado agachamento pode ter produzido uma adaptação neuromuscular, tal como um aumento no número de unidades motoras recrutadas e melhora na sincronização destas unidades motoras. Na segunda hipótese entende-se que há possível aumento da massa muscular decorrente de alterações no equilíbrio entre hormônios anabólicos (testosterona) e catabólicos (cortisol), que não apresentaram variação. Portanto, a primeira hipótese é a mais provável.

Propusemos, neste estudo, investigar o efeito da adição de VTC ao treinamento com exercício de agachamento sobre as concentrações plasmáticas de BDNF. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem sido proposto como uma neurotrofina essencial relacionada com a plasticidade neuronal (KNAEPEN *et al*., 2010) que desempenha um importante papel na sobrevivência de idosos devido ao seu papel na prevenção da morte neuronal durante o stress (CHEVREL *et al*., 2006). Além disso, o perfil de expressão do BDNF mostrou que esta neurotrofina é expressa diferencialmente em músculos esqueléticos sob várias condições fisiológicas e patológicas (CHEVREL *et al*., 2006). Vários estudos têm demonstrado que o BDNF é uma proteína que é produzida em células do músculo esquelético e que a sua expressão é aumentada pela contração gerando aumento da oxidação das gorduras de uma forma dependente da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), provavelmente atuando de forma

autócrina e/ou parácrina dentro dos músculos esqueléticos (CARDINALE *et al*., 2010; UCHIDA *et al*., 2004).

Como resultado, observou-se um aumento significativo dos níveis plasmáticos de BDNF no GP comparado com o GA. Contudo, esta diferença não pode ser atribuída somente ao aumento dos níveis plasmáticos de BNDF no GP, uma vez que o GA mostrou um decréscimo na concentração de BDNF após o treinamento. O recente estudo de Coelho *et al*. (2012) avaliou o impacto de uma intervenção fisioterapêutica sobre os níveis de BDNF em mulheres idosas, classificadas como não-frágeis (569,5 ± 336,6 pg/mL) ou pré-frágeis (396,4 ± 215,1 pg/ml). Nesse estudo, o grupo de treinamento realizou um programa dinâmico progressivo totalizando dez semanas de treinamento resistido dos extensores e flexores do joelho três vezes por semana. Como resultado, ambos os grupos apresentaram um aumento nos níveis de BDNF após a intervenção fisioterapêutica, indicando que o exercício físico e/ou treinamento eleva(m), temporariamente, os níveis basais de BDNF e, possivelmente, regula positivamente o processamento celular de BDNF [isto é, a síntese, a liberação, absorção e degradação] (COELHO *et al*., 2012). Evidências crescentes sugerem que esta família de fatores neurotróficos, influencia não só a sobrevivência e função de neurônios motores, mas também o desenvolvimento e a diferenciação de mioblastos e de fibras musculares (KNAEPEN *et al*., 2010). Considerando-se que: 1) Antes do treinamento, a população do presente estudo apresentava um nível elevado BDNF (GP = 3.630 ± 948,1 pg/mL e GA = 3.013 ± 632,9 pg/mL) em comparação com o estudo de Coelho *et al.* (2012) supracitado; 2) após doze semanas de treinamento, o grupo GP ainda conseguiu promover um aumento nos níveis de BDNF e FIMQ enquanto o grupo GA apresentou uma diminuição nos níveis de plasmáticos de BDNF e na FIMQ; nossa hipótese sugere que exista uma relação entre a melhora de FIMQ e os níveis plasmáticos de BDNF.

Ao avaliar a relação entre a FIMQ e os níveis plasmáticos de BDNF no GP foi observada uma forte correlação entre essas variáveis (*Spearman* r= 0,71 e p<0,003), o que reforça a nossa hipótese de que, possivelmente, a melhora da força muscular isométrica do quadríceps esteja relacionada com a manutenção dos níveis plasmáticos elevados de BDNF nos idosos do grupo GP, levando-nos a acreditar que a melhora na força muscular isométrica do quadríceps no grupo GP ocorreu, provavelmente, devido à adaptação neuromuscular.

Considerando que: a) A literatura vigente indica que as mudanças observadas na força muscular ocorrem em conjunto com alterações no perfil hormonal de idosos (CARDINALE *et al*., 2010); b) As alterações hormonais têm um impacto significativo na fisiologia feminina e desempenho físico (UCHIDA *et al*., 2004); c) Os dados disponíveis na literatura sobre o efeito

do treinamento físico ou exercício crônico sobre as concentrações hormonais são inconclusivos; d) Existem circunstâncias nas quais o treinamento físico levaria a uma diminuição dos andrógenos circulantes (ENEA *et al*., 2011). Nossos resultados demonstram que a adição da VTC aos exercícios de agachamento não modificou a variação (Δ) na relação testosterona/cortisol, demonstrando que o aumento da força muscular na população estudada não foi resultante de mudanças na razão anabolismo (testosterona) e catabolismo (cortisol) hormonal.

Este estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, o tamanho da amostra pode ter sido pequena. Apesar de um tamanho de efeito moderado encontrado na testosterona, na força e nos níveis plasmáticos de BDNF antes da intervenção, não podemos descartar a ocorrência do erro de tipo II, uma vez que o poder apresentado foi de aproximadamente 61% (Portney & Watkins, 2009). Portanto, para evitar que possíveis diferenças encontradas antes do treinamento pudessem influenciar os resultados finais, todas as análises foram realizadas considerando-se os valores das variações (delta= Δ) ocorridas antes e após o período de intervenção. Desta forma, as comparações entre os grupos também foram realizadas com base nessas variações (Δ). Vale ressaltar que o poder estatístico da análise considerando o delta (Δ) foi elevado para a força muscular isométrica do quadríceps (poder > 0,74), as concentrações plasmáticas de BDNF (poder > 0,74) e as concentrações de testosterona salivar (poder > 0,85). No entanto, para a variável cortisol encontramos um baixo poder estatístico, indicando que uma amostra maior poderia melhorar os nossos resultados. A segunda limitação é a de que o nível de BDNF foi medida sistemicamente (no sangue) e não localmente (no fluido sinovial). Diante disso, a variação na concentração sistêmica deste fator pode ter sido influenciada por outros fatores que não a OA propriamente dita, tal como nível de depressão dos voluntários (TAKEBAYASHI *et al.*, 2012; CASTRÉN & RANTAMÄKI, 2010). Uma última limitação foi a utilização de dados apenas do sexo feminino. A OA é cada vez mais reconhecida como tendo especificidades tanto relacionadas ao local e ao gênero e, portanto, os atuais resultados não podem ser diretamente extrapolados para o gênero masculino.

### 4.3.4 Principais achados

Adição do treinamento de VTC ao exercício de agachamento em idosos com OA de joelho, nas condições propostas:

- Promoveu uma melhora na força muscular isométrica do quadríceps femoral;

- Promove uma possível resposta adaptativa na concentração plasmática de BDNF sem alterar a relação de anabolismo/catabolismo muscular.
- Existe uma associação entre a melhora da força muscular isométrica do quadríceps e a concentração plasmática de BDNF.

**4.4 Estudo 3 - Investigar a relação entre as concentrações plasmáticas e no líquido sinovial de BDNF, TNF-α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA de joelho e ainda verficar a relação destes com a gravidade da OA e o autorrelato de dor, rigidez e função física (WOMAC) em idosos com OA de joelho**

Apesar do liquido sinovial ser considerado como o melhor fluído para analisar os eventos ocorridos dentro da articulação (BOGAERTS *et al*., 2007), a análise do plasma é mais rápida, menos invasiva e mais fácil de ser utilizada em mensurações repetidas. A via sanguínea permite, ainda, avaliar resultados de terapêuticas de longo prazo (CARDINALE & POPE, 2003) e tem sido amplamente utilizada nas pesquisas com OA (GOLDRING & GOLDRING, 2004; HAUTIER & BONNEFOY, 2007; ERSKINE *et al*., 2007; CARDINALE *et al*., 2010). Entretanto, as citocinas e as suas concentrações presentes no líquido sinovial e no plasma podem não ser as mesmas.

Atualmente, tem-se discutido que a OA, apesar de ser uma doença articular, apresenta efeitos sistêmicos (MICHAEL *et al*., 2010). Por outro lado, tem sido avaliada a condição sistêmica do paciente (funcionalidade, condições de saúde geral e sangue periférico) na tentativa de inferir a condição inflamatória da cartilagem, dos demais tecidos articulares e do líquido sinovial (PENNINX *et al*., 2004). Desta forma, a determinação da relação entre as concentrações plasmáticas e o líquido sinovial poderia facilitar o entendimento da fisiopatologia local e sistêmica da OA, além de permitir a inferência dos eventos locais a partir da análise do sangue periférico.

A escassez de informações científicas que relacionam os eventos inflamatórios locais (líquido sinovial) e sistêmicos (plasma) é um fato e isto pode levar pesquisadores a conclusões equivocadas em seus estudos. Este esclarecimento é fundamental para subsidiar os achados de pesquisas que partem da premissa de que as alterações verificadas na via sistêmica correspondem às alterações verificadas localmente.

### *4.4.1 Método*

Este é um estudo transversal, em que as variáveis foram analisadas local e sistemicamente. Para minimizar a possibilidade de vieses, os grupos foram percentualmente pareados pelo gênero, idade, altura, peso e IMC, visto que existem relatos na literatura indicando que a gravidade e a sintomatologia da OA de joelho são influenciadas por estas variáveis (SRIKANTH *et al*, 2005; TEICHTAHL *et al*., 2005; GROTLE *et al*., 2008).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri sob protocolo nº 029 /11 (ANEXO 4).

#### *4.4.1.1 Participantes*

A amostra de conveniência deste estudo foi composta por indivíduos com sessenta anos ou mais de ambos os sexos que não relatassem trauma recente no joelho, uso de qualquer dispositivo de auxílio a marcha (por exemplo, bengalas, muletas, andadores); que não tenham recebido tratamento fisioterápico ou qualquer outro procedimento de reabilitação nos últimos três meses e que não tenham feito uso de glicocorticóides por pelo menos dois meses antes da coleta. Dentre os indivíduos analisados, vinte e sete idosos (dezessete mulheres e dez homens, preencheram os critérios clínicos e radiográficos do Colégio Americano de Reumatologia (2002) para o diagnóstico da OA em pelo menos um joelho (grupo OA). Também foram incluídos neste estudo dezenove idosos saudáveis (onze mulheres e oito homens), pareados relativamente com o grupo OA (por gênero, idade, altura, peso e IMC), cujos membros não apresentavam alteração radiográfica nos joelhos, queixa de dor e nem rigidez < trinta minutos e/ou crepitação ao movimento ativo do joelho (grupo controle).

Foram excluídos os participantes que apresentavam doenças reumatológicas, neurológicas, respiratórias ou cardíacas agudas devido à alteração imunológica; também os pacientes que autorrelataram imunossupressão ou imunodeficiência, ou ainda que faziam uso de medicação imunomoduladora.

#### *4.4.1.2 Procedimentos*

Primeiramente, os voluntários receberam uma explicação detalhada sobre os objetivos e procedimentos do estudo. Depois disso, eles assinaram um termo de consentimento e seus

dados demográficos e o autorrelato de dor, rigidez e função física foram coletados. Na sequência, os pacientes do grupo OA foram submetidos à aspiração do líquido sinovial do joelho afetado por punção estéril realizada sempre pelo mesmo cirurgião ortopédico. Nenhum líquido sinovial foi extraído dos idosos do grupo controle devido a questões éticas. As amostras de sangue venoso foram colhidas de todos os participantes, centrifugadas e armazenadas a -70°C até serem usadas.

*4.4.1.3 Avaliação radiográfica e dos parâmetros clínicos e funcionais*

Para garantir que os participantes tinham OA do joelho e para padronizar as amostras de forma confiável, a avaliação radiológica foi realizada em todos os voluntários. A severidade da doença foi determinada utilizando-se radiografias anteroposteriores na postura ortostática do joelho afetado. Radiografias do joelho foram avaliadas de acordo com a classificação de *Kellgren e Lawrence* (1957): grau um: estreitamento do espaço articular duvidoso e possível osteófitos marginais; grau dois: osteófitos definidos e possível estreitamento do espaço articular; grau três: vários osteófitos moderados, estreitamento definido do espaço articular, alguns com esclerose e possível deformidade do contorno ósseo; grau 4: grandes osteófitos, marcado estreitamento do espaço articular, esclerose grave e deformidade definitiva do contorno ósseo. A classificação de grau dois (osteófitos definidos e possível estreitamento do espaço articular) foi usada como um ponto de corte para determinar a OA do joelho. O joelho que apresentou a classificação mais severa em cada paciente do grupo OA foi utilizado para análise de dados.

Os controles foram definidos como não tendo OA radiográfica do joelho pelos critérios de Kellgren e Lawrence (1957), indicado pelo grau zero - nenhuma alteração radiográfica característica de osteoartrite para ambos os joelhos.

O autorrelato de dor, rigidez e função física foi avaliada com WOMAC (ANEXO II) (BELLAMY *et al.*, 1988), que é um instrumento válido e confiável para a OA. Este questionário foi traduzido e adaptado para a população brasileira por Fernandes (2002).

*4.4.1.4 Processamento do plasma e do líquido sinovial*

Para a determinação dos parâmetros inflamatórios sistêmicos e do BDNF, o sangue total (10 mL) foi coletado de forma asséptica, da fossa antecubital, de cada indivíduo por profissionais treinados e capacitados, envolvidos no projeto, utilizando-se heparina como

anticoagulante. O plasma foi separado por dupla centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e estocado a -70°C até a realização dos experimentos.

Para a determinação dos parâmetros inflamatórios e do BDNF locais, o líquido sinovial foi coletado por meio de punção com agulha inserida na região suprapatelar lateral do joelho, da bolsa subquadriciptal realizada por um médico ortopedista, utilizando-se o procedimento padrão. Inicialmente foi realizada a limpeza e assepsia da face ântero-lateral do joelho, seguida de anestesia local com 0,5 mL de xilocaína a 1% sem vasoconstritor (PETERSSON *et al.*, 1997; SAY, 2010). O líquido sinovial foi imediatamente centrifugado duas vezes a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi congelado a –70° C.

*4.4.1.5 Análise dos níveis de BDNF, TNF-α, sTNFR1 e sTNFR2 no plasma e no líquido sinovial*

As concentrações de BDNF, TNF-α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) no plasma e no líquido sinovial dos voluntários foram mensuradas usando a técnica do ELISA sanduíche (*R & D Systems*) conforme protocolo descrito no item 4.1.2.

O limite de detecção para BDNF foi de 10 pg/mL e para TNF-α, sTNFR1 e sTNFR2 foi de 5 pg/mL.

*4.4.1.6 Análise estatística*

Os dados demográficos e antropométricos do grupo OA e controle foram comparados pelo teste *t de Student* não pareado. Comparações entre os grupos foram realizadas utilizando uma análise de variância (ANOVA) com o teste *post hoc* de *Tukey*. Diferença entre a concentração de sTNFR1 e sTNFR2 no plasma e no líquido sinovial foram comparadas pelo teste t de Student pareado. Correlações entre o plasma e o fluido sinovial sTNFR1 e sTNFR2 e gravidade da doença foram avaliadas por meio do coeficiente de correlação de *Spearman* ($r_s$). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para as diferenças e correlações.

*4.4.2 Resultados*

Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à média de idade (68 ± 9 Grupo OA vs 72 ± 8 Controle), peso (70 ± 12,5 Grupo OA vs 70 ± 10,3 Controle), estatura (1,65 ± 0,08 Grupo OA vs 1,64 ± 0,09 Controle) e IMC (25,62 ± 3,01 Grupo OA vs 26,15 ± 3,61 Controle). No que diz respeito aos critérios de KL, os pacientes foram divididos em dois grupos em relação à classificação da OA. Quinze pacientes foram classificados como grau 2 e doze como grau 3 (Tabela 7).

**Tabela 7.** Caracterização da amostra dos grupos OA e controle (Estudo 03).

| Características | Grupo OA (N= 27) | | Grupo Controle (N= 19) | Valor de p |
|---|---|---|---|---|
| Idade (anos) | 68 (9) | | 72 (8) | 0,06 |
| Peso (kg) | 70 (10,5) | | 70 (12,3) | 0,87 |
| Estatura (metros) | 1,65 (0,08) | | 1,64 (0,09) | 0,58 |
| IMC (kg/m$^2$) | 25,62 (3,01) | | 26,15 (3,61) | 0,60 |
| Gravidade da OA de joelho* (%) | 2 | 3 | — | — |
| | 56 | 44 | | |

Dados apresentados em média (SD). * $p \leq 0,05$.
IMC – Índice de massa corporal; OA - Osteoartrite

Além disso, as associações entre os níveis plasmáticos e do líquido sinovial de BDNF, sTNFR1 e sTNFR2 com a gravidade da OA foram estatisticamente investigados. Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de BDNF, sTNFR1 e sTNFR2 no plasma quando comparadas com o líquido sinovial assim como quando comparadas com a gravidade OA do joelho. Além disso, o TNF-α não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

*4.4.2.1 BDNF*

Como mostrado na Figura 10, o grupo controle apresentou menores níveis plasmáticos de BDNF do que pacientes com OA (1756 ± 804,3 pg/mL versus 2378 ± 1067 pg/mL, p= 0,03). Os níveis de BDNF no líquido sinovial de pacientes com OA (358,9 ± 178,4 pg / mL) foram

seis vezes menores do que em amostras de sangue correspondentes (p<0,0001), e quatro vezes menores do que no plasma do grupo controle (p <0,0001) .

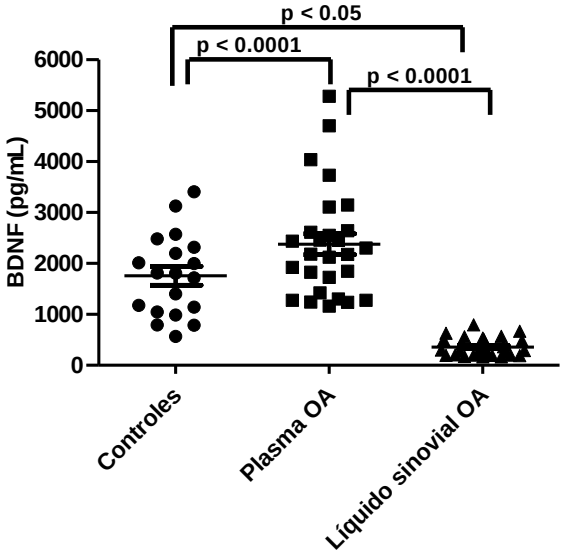



**Figura 10.** Níveis de BDNF no plasma e líquido synovial de pacientes com OA e controles.

Houve uma correlação positiva moderada entre a concentração plasmática BDNF e dor autorrelatada [WOMAC] (rs = 0,39, p = 0,04; Figura 11).

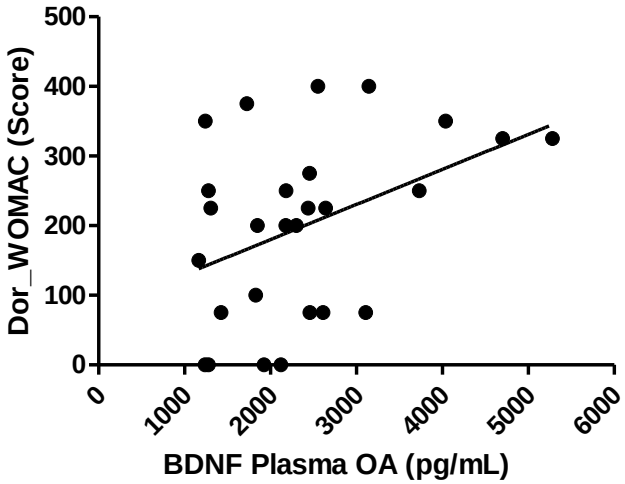



**Figura 11**. Correlação positiva entre os níveis plasmáticos de BDNF em pacientes com OA de joelho e o autorrelato de dor (WOMAC) ($r_s$=0,39; p=0,04).

*4.4.2.2 Receptores soluveis (sTNFR1 e sTNFR2)*

Não houve diferença nos níveis plasmáticos de sTNFR1 entre o grupo OA e o grupo controle (1091 ± 99,48 pg/mL versus 1363 ± 106,7 pg/mL, respectivamente). No entanto, os níveis de sTNFR1 no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (2658 ± 66,12 pg/mL) foram 2,5 vezes maiores do que em amostras de sangue correspondentes, e 1,5 vezes maiores do que no plasma dos controles (Figura 12.A). Não houve correlação entre os níveis de sTNFR1 no plasma e no líquido sinovial no grupo OA. Com relação aos níveis de sTNFR2, tanto os níveis plasmáticos de sTNFR2 (2249 ± 126,3 pg/mL) quanto os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial (2021 ± 107,0 pg/mL) no grupo OA apresentaram-se significativamente mais baixos do que os níveis plasmáticos do grupo controle (2249 ± 126,3 pg/mL versus 2700 ± 126,3 pg/mL e 2021 ± 107,0 pg/mL versus 2700 ± 126,3 pg/mL, respectivamente; Figura 12.B). Não houve correlação entre os níveis plasmáticos sTNFR2 com níveis de sTNFR2 no líquido sinovial.

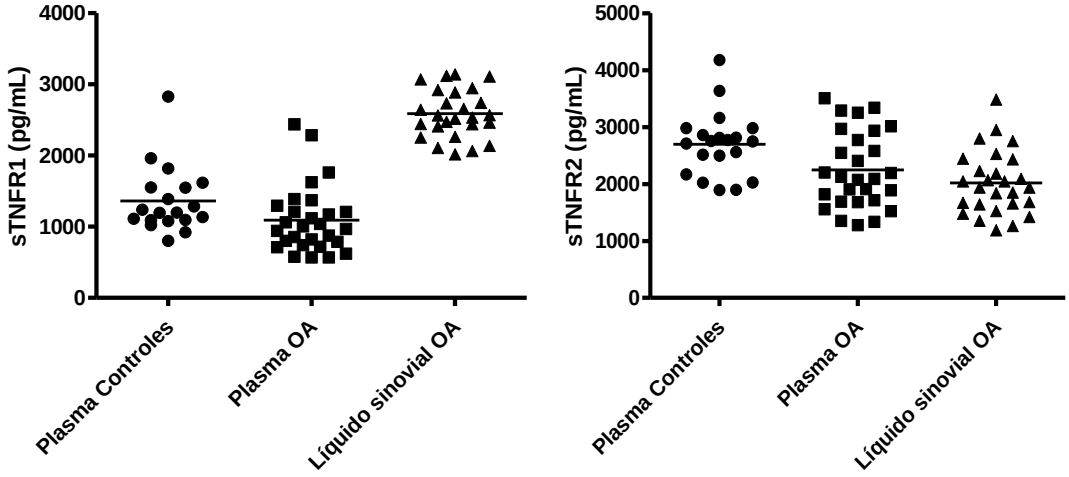



**Figura 12. A)** Níveis dos receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa 1 (sTNFR1) no plasma e no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) (n= 27) e no plasma de controles saudáveis (n= 19), **B)** níveis dos receptores do factor de necrose tumoral alfa 2 (sTNFR2) no plasma e no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) (n= 27) e no plasma de controles saudáveis (n= 19). As linhas horizontais (em negrito) indicam os valores médios.

A figura 13 mostra os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no plasma e no líquido sinovial em pacientes com OA do joelho (1091 ± 99,48 pg/mL versus 2249 ± 126,3 pg/mL e 2587 ± 66,12 pg/mL versus 2021 ± 107,0 pg/mL, respectivamente).

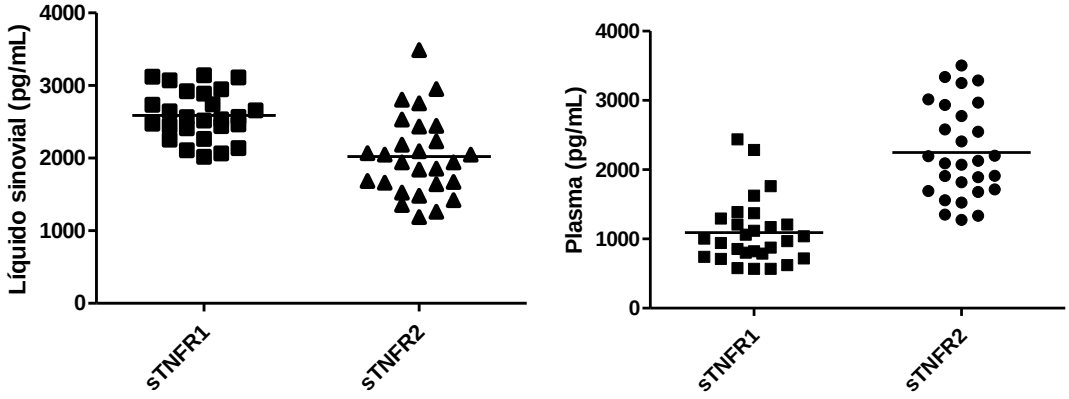
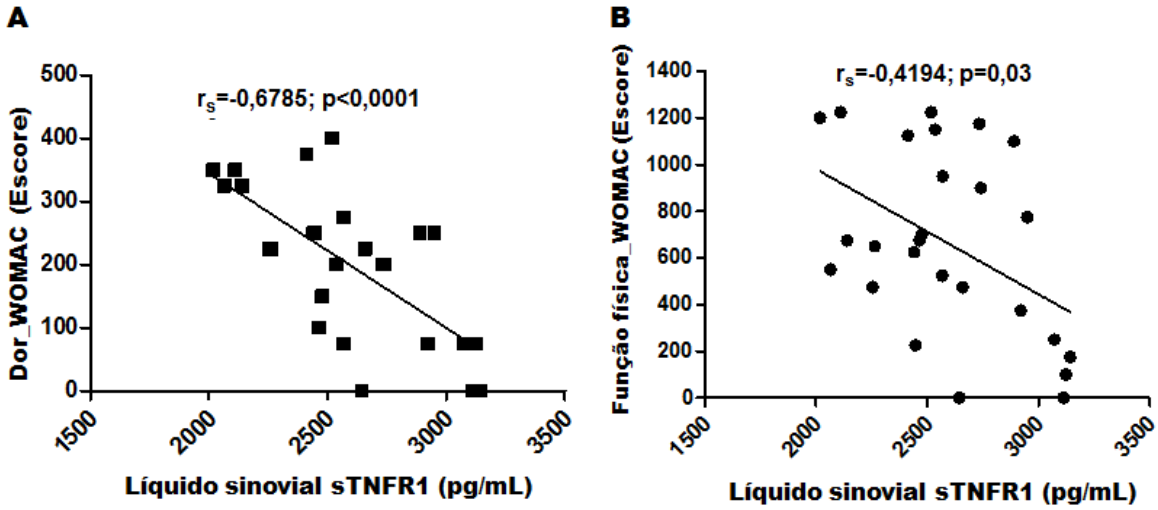



**Figura 13.** Níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial e no plasma de pacientes com osteoartrite de joelho. As linhas horizontais (em negrito) indicam os valores médios.

Foi analisada a associação entre os níveis plasmáticos e o líquido sinovial de sTNFR1 e sTNFR2 com dor, rigidez e função física autorrelatada [WOMAC]. No entanto somente a concentração dos receptores solúveis no líquido sinovial apresentou relação. Os níveis de sTNFR1 no líquido sinovial foram negativamente relacionados com dor e função física autorrelatada ($r_s$- 0,6785, p <0,0001 e $r_s$- 0,4194, p = 0,03, respectivamente) (Figura 14. A e B, respectivamente). Já os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial foram negativamente relacionados com dor e rigidez articular ($r_s$- 0,5433, p= 0,01 e $r_s$- 0,4249, p= 0,02, respectivamente) (Figura 14. C e D , respectivamente).



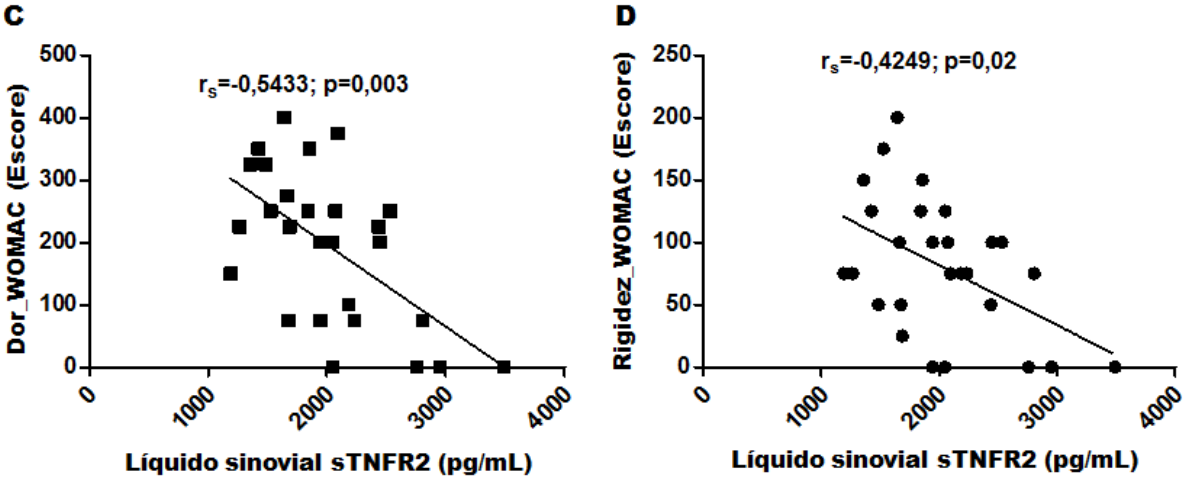



**Figura 14.** Correlação negativa entre os níveis de receptores solúveis do fator de necrose tumoral (sTNFR) no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite do joelho (OA) com os parâmetros clínicos e funcionais (WOMAC). **A)** Níveis de sTNFR1 no líquido sinovial relacionaram negativamente com a intensidade da dor (WOMAC), **B)** Os níveis de sTNFR1 no líquido sinovial relacionaram negativamente com o desempenho funcional (WOMAC), **C)** Os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial relacionaram negativamente com a intensidade da dor (WOMAC), **D)** Os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial relacionaram negativamente com a rigidez articular (WOMAC).

### *4.4.3 Discussão*

Estudos anteriores demonstraram que o BDNF está presente no líquido sinovial das articulações inflamadas em pacientes com espondiloartrite (RIHL *et al*., 2005), artrite reumatóide (RA) (RIHL *et al.*, 2005; KLEIN *et al*., 2012) e OA (RIHL *et al*., 2005; KLEIN *et al*., 2012). No entanto, existem lacunas na literatura no que diz respeito às diferenças nos níveis de BDNF no plasma e líquido sinovial de pacientes idosos com OA do joelho em comparação com um grupo de idosos controles saudáveis. Além disso, não se sabe se há alguma relação entre os níveis de BDNF e os parâmetros clínicos, com o autorrelato da dor. Este estudo é o primeiro a demonstrar a presença de BDNF, tanto no plasma quanto no líquido sinovial dos pacientes com OA do joelho primária. Os níveis de BDNF no líquido sinovial de pacientes com OA foram seis vezes menores do que nas amostras de sangue correspondentes e 4 vezes mais baixas do que no plasma de idosos controles saudáveis. Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de BDNF e a dor autorrelatada.

Embora os pacientes com osteoartrite do joelho tivessem apresentado níveis marcadamente mais elevados de BDNF no plasma do que no líquido sinovial, não houve correlação entre as concentrações local e sistêmica. O estudo de Rihl *et al*. (2005) também não mostrou correlação significativa entre os níveis de BDNF no soro e no líquido sinovial de

pacientes com OA e espondiloartrite. Estes autores comentaram que a falta de correlação pode estar relacionada com o fato de que os níveis de BDNF encontrados no líquido sinovial são produzidos pelo condrócitos, com funções autócrina e parácrina na cartilagem articular, em resposta ao processo inflamatório articular (KLEIN *et al*., 2012; YAMASHIRO *et al*., 2001).

Outro achado deste estudo foi que os níveis plasmáticos de BDNF em pacientes idosos saudáveis foi menor do que em pacientes idosos com OA do joelho. Esta descoberta é contrária ao estudo de Rihl *et al*. (2005), os quais encontraram uma concentração elevada de BDNF no plasma de indivíduos saudáveis comparado com pacientes com espondiloartrite, AR e OA. Uma possível explicação para a diferença entre os estudos pode estar relacionada com a fase do processo inflamatório em que se encontravam os pacientes com OA. Os pacientes no grupo de OA do estudo de Rihl *et al*. (2005) estavam na fase de remissão da OA (fase crônica), enquanto que os pacientes com OA do presente estudo estavam em uma fase aguda do processo inflamatório e apresentando derrame articular considerável, o que justificou a conduta clínica de punção do líquido sinovial para alívio sintomático da dor.

A dor na OA tem sido descrita como um fator de estresse que aumenta a resposta inflamatória, considerada um elo crítico no ciclo dor e inflamação que perpetua condições dolorosas crônicas. Este processamento da dor na OA vem sendo relacionado às alterações no processamento da dor periférica associado a uma disfunção no processamento da dor central (LEE *et al.*, 2011). Neste estudo foram encontradas correlações entre o autorrelato de dor com os níveis plasmáticos de BDNF e com os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial em pacientes com OA do joelho, sendo que houve uma correlação positiva entre a dor autorrelatada com os níveis plasmáticos de BDNF e uma correlação negativa entre a dor autorrelatada e os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial. A correlação entre dor e níveis de BDNF é apoiada pela literatura, em que Grimsholm *et al.* (2008) identificaram que a expressão de BDNF em pacientes com AR e em pacientes com OA não tem só efeitos neuroprotetores mas, também, efeito na mediação da dor. Uma hipótese para estes resultados pode estar relacionada com controle local e central da dor, visto que na fase aguda da OA, o aumento do processo inflamatório produz quadro álgico intenso estimulando, assim, a produção de BDNF sistêmico, em uma tentativa de modular a dor no sistema nervoso central. Já o controle local da dor pode estar relacionado com o controle do processo inflamatório articular, já que os níveis elevados de sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial estavam relacionados com menor queixa de dor. Possivelmente, o aumento dos níveis locais de sTNFR1 e sTNFR2 inibiram a ação catabólica do TNF-α por meio de suas ligações ao TNF-α inativando-o pela consequente inibição da sua ligação aos receptores de membrana, assim como pela menor oferta dos próprios receptores de

membrana. De acordo com a literatura, os receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 são derivados da clivagem das formas encontradas na superfície celular pela enzima proteinase de conversão do TNF-α (TACE). Estes receptores solúveis do TNF-α concorrem com o receptor de superfície na ligação com o TNF-α modulando sua atividade inflamatória, sendo sugerido que eles funcionam como atenuadores fisiológicos da atividade nociva do TNF-α (ADERKA *et. al*., 1992; WAETZIG *et. al*., 2005).

Ao compararmos estes resultados da associação local dos níveis de sTNFR1 e sTNFR2 com o autorrelato de dor com estudos que avaliaram esta mesma associação, porém, sistemicamente (plasma), observamos resultados contraditórios. No estudo de Penninx *et al*. (2004), foi considerado que os níveis plasmáticos elevados de receptores solúveis para TNF-α estavam associados com a diminuição da função física, aumentos dos sintomas da OA (por exemplo, um aumento da dor e rigidez) e piores escores radiográficos em idosos obesos com OA do joelho. Uma possível explicação para os diferentes resultados obtidos pode estar relacionada com a fase do processo inflamatório em que se encontravam os pacientes com OA durante as análises, já que neste estudo os pacientes estavam em fase de agudização do processo inflamatório e no estudo de Penninx *et al*. (2004) os pacientes se encontravam no período de remissão da OA, fase crônica do processo inflamatório. Por outro lado, é possível que não exista uma relação entre os processos local e sistêmico em pacientes com OA de joelho, visto que não encontramos corrrelação entre os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no plasma e no líquido sinovial do grupo OA.

Estudos anteriores também demonstraram a presença de sTNFR1 e sTNFR2 no fluido sinovial da articulação inflamada de pacientes com artrite reumatóide (STEINER *et al*., 1995; COPE *et al*., 1992; KLIMIUK *et al*, 2003), na artrite psoriática (FIOCCO *et al*., 2012) na atividade da artrite na doença de Behçet (TURAN *et al*., 2008) e OA em articulações temporomandibulares (UEHARA *et al*, 2004; KANEYAMA *et al*, 2005). No entanto, os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no plasma e no líquido sinovial de pacientes com OA do joelho não foram explorados e muito menos as suas relações com a gravidade da doença, com a dor, a rigidez e a função física autorrelatada.

Com isso, este estudo é o primeiro a mostrar que foram detectados sTNFR1 e sTNFR2 simultaneamente no plasma e no líquido sinovial obtido de pacientes com OA do joelho primária e que os níveis sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial foram correlacionados, negativamente, com a autoavaliação de parâmetros clínicos.

Em outras doenças articulares, assim como na OA, um elevado nível destes receptores tem sido demonstrado como importante na rede das citocinas, uma vez que a atividade biológica

das citocinas depende da sua ligação a receptores específicos de membrana em células alvo (KANEYAMA *et al*., 2005). Sendo assim, os receptores solúveis, tais como sTNFR1 e sTNFR2 podem atuar como antagonistas de TNF-α, bloqueando a interação do TNF-α com o seu receptor de membrana celular, competindo, desta forma, com o receptor de membrana pela ligação com o TNF-α (CAÑETE *et al*., 2010; KANEYAMA *et al*., 2005). Em tais condições artríticas, os receptores solúveis apresentam-se em concentrações relativamente elevadas, enquanto que as citocinas, ou não são detectáveis, ou estão presentes em baixas concentrações (ROUX-LOMBARD *et al*., 1993; KANEYAMA *et al*., 2005). Estas declarações estão em concordância com os resultados deste estudo, em especial na avaliação local (líquido sinovial), em que o nível de sTNFR1 se mostrou expressivamente elevado, enquanto que não foi detectada a presença de TNF-α no fluido sinovial de pacientes com OA do joelho. Esta descoberta apoia a hipótese de que o aumento do nível de sTNFR1 é uma reação protetora que bloqueia ou inibe os efeitos colaterais induzidos pela exacerbada secreção de TNF-α. Desde que sTNFRs podem ser regulados positivamente por citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF-α, este tipo de mecanismo *feedback* inibidor parece ser eficaz na prevenção da destruição da cartilagem articular do joelho com OA (UEHARA *et al*., 2004).

Como o nível de TNF-α é um importante indutor dos níveis de sTNFR1 e sTNFR2, estes últimos são de grande importância nas doenças citadas, em que uma cascata de citocinas dependentes de TNF-α tem sido observada em muitas respostas imunológicas e os inibidores da inflamação e da produção de citocinas, tais como os sTNFRs são, também, suprarregulados (EDWARDS *et al*., 2006; TURAN *et al*., 2008; CAÑETE *et al*., 2010). A inibição de TNF-α *in vitro* demonstrou reduzir as ações de muitos outros mediadores pró-inflamatórios (CAÑETE *et al*., 2010; COPE *et al*., 1993). Estes achados indicam que as citocinas pró-inflamatórias estão ligadas em rede ou em cascata, com o TNF-α ocupando o ápice (KANEYAMA *et al*., 2005). Portanto, a presença de níveis aumentados de sTNFR1 e ausência de TNF-α no líquido sinovial de pacientes com OA de joelho sugerem que uma relação estreita entre estas variáveis pode contribuir com o processo patológico da OA do joelho.

Devido à presença de vários tipos de células no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide, a proporção dos sTNFRs no líquido sinovial pode variar. Por exemplo, na OA da articulação temporomandibular, o líquido sinovial tem uma maior concentração de sTNFR1 que de sTNFR2 (KANEYAMA *et al*., 2005). Na AR, contudo, a proporção inversa é verdadeira (STEINER *et al*., 1995; COPE *et al*., 1992). Nossos resultados sugerem que há um aumento da produção local sTNFR1 na OA do joelho. De acordo com estudos anteriores, em geral, altas concentrações de sTNFRs no líquido sinovial indicam a

produção local desses receptores nas proximidades da articulação (KANEYAMA *et al*., 2005; TURAN *et al*., 2008). Vale ressaltar que o nível de sTNFR1 no líquido sinovial foi muito mais elevado que o observado em amostras de plasma do próprio paciente. Outro achado importante deste estudo foi que o nível de sTNFR1 apresentou-se mais elevado do que o nível de sTNFR2 no líquido sinovial. Essa elevação substancial de sTNFR1 no líquido sinovial pode ser, presumivelmente, atribuído à expressão preferencial do sTNFR1 em condrócitos articulares humanos (ALSALAMEH *et al*., 1999; ROUX-LOMBARD *et al*., 1993).

Neste estudo, o nível de sTNFR1 no líquido sinovial foi negativamente correlacionado com sintoma de dor e função física autorrelatada em pacientes com OA do joelho, enquanto o nível de sTNFR2 no líquido sinovial foi negativamente correlacionado com sintoma de dor e rigidez articular autorrelatada. Em outras palavras, quando a concentração de sTNFR1 e sTNFR2 apresentaram-se diminuídas, houve piora da sintomatologia apresentada pelos pacientes com OA de joelho. Esses achados reforçam a idéia de que a regulação positiva dos receptores solúveis na articulação acometida é um fator protetor da atividade do TNF-α na inflamação articular em pacientes com osteoartrite de joelho tal como ocorre na OA da articulação temporomandibular (UEHARA *et al*., 2004; KANEYAMA *et al*., 2005). No entanto, não foi encontrada qualquer correlação entre os níveis plasmásticos ou no líquido sinovial de sTNFR1 e sTNFR2 com a gravidade da OA do joelho. Uma explicação para este resultado pode ser o fato de que as alterações radiológicas podem estar refletindo o processo normal de envelhecimento da cartilagem articular, enquanto que a dor pode representar o processo anormal entre a síntese e a degradação da cartilagem, associada com irritação da membrana sinovial e lesão óssea subcondral (FERNANDES *et al*., 2007). Outro ponto que não pode ser negligenciado é a característica da amostra deste estudo, em que havia apenas pacientes classificados como grau dois e três de OA do joelho. Talvez a ausência de pacientes com classificação grau quatro de OA do joelho pode ter contribuído com a ausência de correlação visto que estudos que encontraram correlação entre a gravidade da OA e a concentração de marcadores bioquímicos tiveram, em suas amostras, pacientes classificados como grau quatro de OA do joelho (HONSAWEK *et al*., 2012; HONSAWEK & CHAYANUPATKUL *et al*., 2010; HONSAWEK *et al*., 2009).

Este estudo apresenta algumas deficiências inerentes. Em primeiro lugar, a investigação foi realizada em apenas um centro, com um número relativamente pequeno de participantes. Estudos adicionais realizados em uma amostra aleatória de múltiplos centros com amostras maiores são necessários para validar os resultados. Em segundo lugar, as amostras de líquido sinovial de controles saudáveis não foram coletadas por razões éticas, o que impossibilitou a

comparação local entre os grupos. Em terceiro lugar, os nossos pacientes com OA do joelho estavam em fase de inflamação articular aguda, portanto, os nossos resultados não podem ser considerados para pacientes em fase de remissão (fase crônica) da OA do joelho. Por último, como este foi um estudo transversal, a definição de causa e as relações com efeito podem não ser possíveis. No entanto, investigações longitudinais prospectivas são necessárias para demonstrar a progressão da doença e determinar o papel exato do BDNF, de sTNFR1 e de sTNFR2 na OA do joelho.

### *4.4.4 Principais achados*

Em resumo, o presente estudo demonstrou que:

- há presença de BDNF, sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial de pacientes com OA primária do joelho;
- níveis de TNF-α não foram detectados nas amostras de plasma e de líquido sinovial de pacientes com OA;
- existe uma associação de sTNFR1 e sTNFR2 com parâmetros clínicos (WOMAC);
- os níveis plasmáticos de BDNF foram significativamente elevados em pacientes com OA do joelho em comparação com idosos controles;
- os níveis de BDNF no líquido sinovial foram notavelmente menores do que nas amostras de plasma do próprio paciente;
- foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de BDNF e a dor autorrelatada em pacientes com OA do joelho;
- não foram encontradas correlações entre os níveis local e sistêmico de sTNFR1, sTNFR2 e BDNF.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos indicam que:

1- A adição do treinamento de vibração de todo o corpo ao exercício de agachamento, nas condições experimentais propostas, proporciona melhora do equilíbrio estático e dinâmico e do desempenho de marcha ao mesmo tempo que reduz a autopercepção de dor e a concentração de marcadores inflamatórios (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA de joelho.

2- A adição do treinamento de vibração de todo o corpo ao exercício de agachamento promove uma melhora no desempenho muscular de membros inferiores em mulheres idosas com OA de joelho. Além disso, há uma resposta adaptativa na concentração de BDNF (indicando um possível papel na plasticidade de motoneurônios que inervam a musculatura do membro inferior – especialmente o quadríceps) sem alteração na relação muscular de anabolismo/catabolismo (que influencia o trofismo muscular).

3- A existência de BDNF e de receptores solúveis de TNF-α (sTNFR1 e sTNFR2) no líquido sinovial de pacientes com OA primária do joelho na fase inflamatória aguda e a relação destes com parâmetros clínicos, sendo os níveis de BDNF plasmáticos elevados em pacientes com OA do joelho em comparação com idosos saudáveis e que os níveis de BDNF no líquido sinovial são, notavelmente, menores do que nas amostras de plasma do próprio paciente. Além disso, os níveis de BDNF no líquido sinovial apresentam-se reduzidos em comparação com os níveis plasmáticos de BDNF em idosos saudáveis.

4- Ocorrência de uma relação entre parâmetros clínicos e os níveis plasmáticos de BDNF, sendo esta correlação positiva entre os níveis plasmáticos de BDNF com a dor autorrelatada em pacientes com OA do joelho e relação negativa tanto entre os níveis de sTNFR1 no líquido sinovial com a dor e a rigidez autorrelatada quanto entre os níveis de sTNFR2 no líquido sinovial com a dor e a função física autorrelatada, demonstrando que, possivelmente, a regulação positiva dos receptores solúveis na articulação acometida é um fator protetor da atividade do TNF-α na inflamação articular de pacientes com osteoartrite de joelho.

5- Abre a perspectiva para futuros estudos delinearem os mecanismos subjacentes a esta associação, bem como obter informações sobre o papel preciso do BDNF, sTNFR1 e sTNFR2 na patogênese do processo degenerativo em pacientes com OA do joelho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBY, A.F.J.; AMONETTE, W.E.; LAYNE, C.S.; McFARLIN, B.K.; HINMAN, M.R.; PALOSKI, W.H. Variation in neuromuscular responses during acute whole-body vibration exercise. Med Sci Sports Exerc, Indianapolis, v.39, p.1642-1650, Sep. 2007.

ABREU SSE, CALDAS CP. Gait speed, balance and age: a correlational study among elderly women with and without participation in a therapeutic exercise program. Rev Bras Fisioter, São Carlos, v.12, p.324-330, Aug. 2008.

ADERKA D, ENGELMANN H, MAOR Y, BRAKEBUSCH C, WALLACH D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. J Exp Med, New York, v.175, n.2, p.323-329, Feb. 1992.

AIZAWA, K.; AKIMOTO, T.; INOUE, H.; KIMURA, F.; JOO, M.; MURAI, F.; MESAKI, N. Resting serum dehydroepiandrosterone sulfate level increases after 8-week resistance training among young females. European Journal of Applied Physiology, Heidelberg, v.90, p.575-580, Nov. 2003.

ALSALAMEH S, MATTKA B, AL-WARD R. Preferential expression of tumor necrosis factor receptor 55 (TNF-R55) on human articular chondrocytes: selective transcriptional upregulation of TNF-R75 by proinflammatory cytokines interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and basis fibroblast growth factor. J Rheumatol, Toronto, v.26, p.645-653, Mar. 1999.

ATS COMMITTEE ON PROFICIENCY STANDARDS FOR CLINICAL PULMONARY FUNCTION LABORATORIES. ATS statement: guidelines for the six minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. New York, v.166, p.111-117, Jul. 2002.

AVDIC D, PECAR D. Significance of specificity of Tinetti B-POMA test and fall risk factor in third age of life. Bosn J Basic Med Sci, Sarajevo, v.6, n.1, p.50-57, Feb. 2006.

AVELAR NCP, SIMÃO AP, TOSSIGE-GOMES R, NEVES CD, ROCHA-VIEIRA E, COIMBRA CC, LACERDA AC. The effect of adding whole body vibration to squat training on the functional performance and self-report of disease status in elderly patients with knee

osteoarthritis: a randomized controlled clinical study. J Altern Complement Med, New York, v.17, p.1-7, Dec. 2011.

BELLAMY N, BUCHANAN WW, GOLDSMITH CH, CAMPBELL J, STITT LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. J Rheumatol, Toronto, v.15, n.12, p.1833-1840, 1988.

BERG KO, MAKI BE, WILLIAMS JI, HOLLIDAY PJ, WOOD-DAUPHINEE SL. Clinical and laboratory measures of postural balance in an elderly population. Arch Phys Med Rehabil, Chicago, v.73, p.1073-1080, Nov. 1992.

BERTOLUCCI PH, BRUCKI SM, CAMPACCI SR, JULIANO Y. O mini-exame do estado mental em uma populaçäo geral: impacto da escolaridade. Arq Neuropsiquiatr, São Paulo, v.52, p.1-7, Mar. 1994.

BOGAERTS A, DELECLUSE C, CLAESSENS AL, BOONEN S. Impact of whole body vibration training versus fitness training on muscle strength and muscle mass in older men: A 1-year randomized controlled trial. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, Oxford, v.62, p.630-5, Jun. 2007.

BONDESON J, WAINWRIGHT S, HUGHES C, CATERSON B. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. Clin Exp Rheumatol, Pisa, v.26, n.1, p.139-45, 2008.

BROWN LE, WEIR JP. Procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. Rev Bras Ci e Mov, Distrito Federal, v.11, p.95-110, 2003.

BRUCKI SM, NITRINI R, CARAMELLI P, BERTOLUCCI PH, OKAMOTO IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. Arq Neuropsiquiatr, São Paulo v.61, n.3B, p. 777-81, Sep. 2003.

CAÑETE JD, ALBADEJO C, HERNANDEZ MV, LAÍNEZ B, PINTO JA, RAMIREZ J, LÓPEZ-ARMADA MJ, RODRIGUES-CROS JR, ENGEL P, BLANCO FJ, SANMARTI R.

Clinical significance of high levels of soluble tumour necrosis factor-α receptor-2 produced by alternative splicing in rheumatoid arthritis: a longitudinal prospective cohort study. Rheumatology.Oxford, v.50, p.721-728, Apr. 2011.

CARAMES B, LOPEZ-ARMADA MJ, CILLERO-PASTOR B, LIRES-DEAN M, VAAMONDE C, GALDO F, BLANCO FJ. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, Philadelphia, v.16, n.6, p.715-22, 2008.

CARDINALE M, POPE MH. The effects of whole body vibration on humans: dangerous or advantageous? Acta Physiol Hung, Budapest, v.90, n.3, p.195-206, 2003.

CARDINALE M, SOIZA RL, LEIPER JB GIBSON A, PRIMROSE WR. Hormonal responses to a single session of wholebody vibration exercise in older individuals. Br J Sports Med, London, v.44, p.282-88, Mar. 2010.

CASTRÉN E, RANTAMÄKI T. Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: implications for pharmacological treatment. CNS Drugs, Philadelphia, v.24, n.1, p.1-7, Jan. 2010.

CHERWINSKI HM, SCHUMACHER JH, BROWN KD, MOSMANN TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. J Exp Med, New York, v.166, p.1229-1244, Nov. 1987

CHEVREL G, HOHLFELD R, SENDTNER M. The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. Muscle and Nerve, New York, v.33, n.4, p.462–476, Apr. 2006.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. The Journal of the American Medical Association, Chicago, v.267, p.1244-52, Mar. 1992.

COCHRANE DJ, SARTOR F, WINWOOD K, STANNARD SR, NARICI MV, RITTWEGER J. A comparasion of the physiologic effects of acute whole body vibration exercise in young and older people. Arch Phys Med Rehabil, Chicago, v.89, p.815-21, May. 2007.

COCHRANE DJ, STANNARD SR, FIRTH EC, RITTWEGER J. Acute whole body vibration elicits post-activation potentiation. Eur J Appl Physiol, New York, v.108, p.311-19, Jan. 2010

COELHO FM, PEREIRA DS, LUSTOSA LP, SILVA JP, DIAS JMD, DIAS RCD, QUEIROZ BZ, TEIXEIRA AL, TEIXEIRA MM, PEREIRA LSM. Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women. Archives of Gerontology and Geriatrics, Amsterdam, v.54, n.3, p.415-20, May-Jun. 2012.

COHEN J. Quantitative methods in psychology: A power prime. Psychol Bull. New York, v.112, p.155-159, Jan, 1992.

COHEN J. The earth is round ($p$ <.05). Am Psychol. Washington, v.49, p.997-1003, Dec. 1994.

COPE AP, ADERKA D, DOHERTY M, ENGELMANN H, GIBBONS D, JONES AC, et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. Arthritis Rheum, Atlanta, v.35, n.10, p.1160-1169, Oct. 1992.

COPE AP, GIBBONS DL, ADERKA D, FOXWELL, BM, WALLACH D, MAINI RN, FELDMANN M, BRENNAN FM. Differential regulation of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) by IL-4; Upregulation of P55 and P75 TNF-R on synovial joint mononuclear cells. Cytokine, San Diego, v.5, n.3, p.205-212, May. 1993.

CROWLEY M, MATT KS. Hormonal regulation of skeletal muscle hypertrophy in rats: the testosterone to cortisol ratio. Eur J Appl Physiol, Berlim, v.73, p.66-72, Jan. 1996.

DELECLUSE C, ROELANTS M, VERSCHUEREN S. Strength increase after whole-body vibration compared with resistance training. Med Sci Sports Exerc, Hagerstown, v.35, n.6, p.1033-41, Jun. 2003.

DUNLOP DD, SEMANIK P, SONG J, SHARMA L, NEVITT M, JACKSON R, MYSIW J, CHANG RW. Moving to maintain function in knee osteoarthritis: evidence from the osteoarthritis initiative. Arch Phys Med Rehabil, Philadelphia, v.91, p.714-21, May, 2010.

EDWARDS CK, BENDELE AM, REZNIKOV LI, FANTUZZI, CHIPALA ES, LI L, MOLDAWER LL, MOUNTZ JD, YY-Y LI, DINARELLO CA. Soluble human p55 and p75 tumor necrosis fator receptors reverse spontaneous arthritis in transgenic mice expressing transmembrane tumor necrosis fator alpha. Arthritis and Rheumatism, Atlanta, v.54, n.9, p.2872-2885, Sep. 2006.

ELLOUMI M, BEN OUNIS O, TABKA Z, VAN PRAAGH E, MICHAUX O, LAC G. Psychoendocrine and physical performance responses in male Tunisian rugby players during an international competitive season. Aggress Behav, New York, v.34, p.623–32, Nov-Dec. 2008.

ENEA C, BOISSEAU N, FARGEAS-GLUCK MA, DIAZ V, DUGUÉ B. Circulating androgens in women: exercise-induced changes. Sports Med, Auckland, v.41, p.1-15, Jan. 2011.

ENGLUND M. The role of biomechanics in the initiation and progression of OA of the Knee. Best Pract Res Clin Rheumatol, Amsterdam, v.24, p.39-46, Feb. 2010.

ERSHLER, W. B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. J. Am. Geriatr. Soc, New York, v.41, p.176-181, Feb. 1993.

ERSKINE J, SMILLIE I, LEIPER J, BALL D, CARDINALE M. Neuromuscular and hormonal responses to a single session of whole body vibration exercise in healthy young men. Clin Physiol Funct Imaging, Oxford, v.27, p.242-48, Jul. 2007.

FERNANDES FA, PUCINELLI MLC, DA SILVA NP, FELDMAN D. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in knee osteoarthritis in a Brazilian population: clinical and radiological correlation. Scand J Rheumatol. Stockholm v.36, p.211–215, May-Jun. 2007.

FERNANDES JC, MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology, Oxford, v.39 n.1-2, p.237-46, 2002.

FERNANDES MI. Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para a osteoartrose WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthtis Index) para a língua portuguesa [Dissertação]. Universidade Federal de São Paulo, 2002.

FERREIRA FO, LIMA EP, PEIXOTO MAL, HAASE VG. O Uso de Testes Neuropsicológicos na Esclerose Múltipla e Epilepsia do Lobo Temporal: Relevância da Estimativa de Magnitude do Efeito. Rev Interameric de Psicol. Porto Alegre, v.4, p.1-16, Aug. 2008.

FIOCCO U, OLIVIERO F, SFRISO P, CALABRESE F, LUNARDI F, SCAGLIORI E, RUBALTELLI L, STRAMARE R, DI MAGGIO A, NARDACCHIONE R, COZZI L, MOLENA B, FELICETTI M, GAZZOLA K, LO NIGRO A, ACCORDI B, ROUX-LOMBARD P, DAYER JM, PUNZI L. Synovial biomarkers in psoriatic arthritis. J Rheumatol Suppl, Toronto, v.89, p.61-64, Jul. 2012.

FLANAGAN S, SALEM GJ, WANG MY, SANKER SE, GREENDALE GA. Squatting exercise in older adults: Kinematic and Kinetic comparisons.
Med Sci Sports Exerc 35: 635–643, 2003.

GARRIDO R, MENEZES PR. O Brasil está envelhecendo: boas e más notícias por uma perspectiva epidemiológica. Rev Brasil Psiquiat. São Paulo, v.24, n.1, p.3-6, 2002.

GLASS NA, TORNER JC, FREY LAW, LA, WANG K, YANG T, NEVITT MC, FELSON DT, LEWIS CE, SEGAL NA. The relationship between quadriceps muscle weakness and worsening of knee pain in the MOST cohort: a 5-year longitudinal study. Osteoarthritis and Cartilage, London, v.21, p.1154-1159, Sep. 2013.

GOEKOOP RJ, KLOPPENBURG M, KROON HM, FROLICH M, HUIZINGA TW, WESTENDORP RG, et al. Low innate production of interleukin-1beta and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age. Osteoarthritis Cartilage, London v.18, n.7, p.942-7, Jul. 2010.

GOKHALE R, CHANDRASHEKARA S, VASANTHAKUMAR KC. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes--an adaptive response. Cytokine, Phyladelphia, v.40, n.2, p.123-127, Nov. 2007.

GOLDRING MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. Curr Rheumatol Rep, Phyladelphia, v.2, n.6, p.459-65, Dec. 2000.

GOLDRING SR, GOLDRING MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. Clin Orthop Relat Res, Phyladelphia s. 427, p.S27-36, Oct. 2004.

GOMES WF, LACERDA ACR, MENDONÇA VA, ARRIEIRO NA, FONSECA SF, AMORIM MR, ROCHA-VIEIRA E, TEIXEIRA AL, TEIXEIRA MM, MIRANDA AS, COIMBRA CC, BRITO-MELO GEA. Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise. Clin. Rheumatol, Heidelberg, v.31, p.759-766, May. 2012.

GRIMSHOLM O, DAHLQVIST SR, DALÉN T, FORSGREN S. BDNF in RA: Downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters. Clin Rheumatol, Heidelberg, v.27, p.289-1297, Oct. 2008.

GROTLE. M.; HAGEN, K. B.; NATVIG, B.; DAHL, F. A.; KVIEN, T. K. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. BMC Musculoskelet Disord, London, v.2, n.9, p.132-137, Oct. 2008.

HAUTIER C, BONNEFOY M. Training for older adults. Ann Readapt Med Phys, Amsterdam, v.50, n.6, p.475-9, 69-74, Jul. 2007.

HINTON R, MOOD RL, DAVIS AW, THOMAS SF. Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. Am Family Phys, Kansas City, v.65, p.841-848, Mar. 2002.

HONSAWEK S, CHAYANUPATKUL M. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in plasma and synovial fluid is inversely associated with disease severity of knee osteoarthritis. Clinical Biochemistry. Toronto, v.43, p.1133–1137, Sep. 2010.

HONSAWEK S, TANAVALEE A, SAKDINAKIATTIKOON M, CHAYANUPATKUL M, YUKTANANDANA P. Correlation of plasma and synovial fluid osteopontin with disease severity in knee osteoarthritis. Clin Biochem. Toronto, v.42, n.9, p.808-12, Jun. 2009.

HONSAWEK S, YUKTANANDANA P, TANAVALEE A, SAETAN N, ANOMASIRI W, PARKPIAN V. Correlation between plasma and synovial fluid basic fibroblast growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. Int Orthop. Berlim, v.36, n.5, p.981-985, May. 2012.

JAN MH, LIN CH, LIN YF, LIN JJ, LIN DH. Effects of weightbearing versus nonweight-bearing exercise on function, walking speed, and position sense in participants with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. Arch Phys Med Rehabil, Chicago, v.90, p.897-904, jun. 2009.

JEKEL JF, KATZ DL, WILD D, ELMORE JG. Epidemiology biostatistics and preventive medicine 2nd edition Saunders: Philadelphia, 2001. 417p.

JORDAN, M. J., NORRIS, S. R., SMITH, D. J., HERZOG, W. Vibration training: an overview of the area, training consequences, and future considerations. J Strength.Cond.Res, Champaign, v.19, p.459-466, May. 2005.

KANEYAMA K, SEGAMI N, SUN W, SATO J, FUJIMURA K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1β, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin- 1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod, St. Louis, v.99, p.276-284, Mar. 2005.

KANEYAMA K, SEGAMI N, YOSHIMURA H, HONJO M, DEMURA N. Increased levels of soluble cytokine receptors in the synovial fluid of temporomandibular joint disorders in relation to joint effusion on magnetic resonance images. J Oral Maxillofac Surg, Philadelphia, v.68, n.5, p.1088-1093, May. 2010.

KAWANABE K, KAWASHIMA A, SASHIMOTO I, TAKEDA T, SATO Y, IWAMOTO J. Effect of whole-body vibration exercise and muscle strengthening, balance, and walking exercises on walking ability in the elderly. Keio J Med. Tokyo, v.56, n.1, p.28-33, Mar. 2007.

KEAN CO, BIRMINGHAM TB, GARLAND SJ, BRYANT DM, GIFFIN JR. Minimal detectable change in quadriceps strength and voluntary muscle activation in patients with knee osteoarthritis. Arch Phys Med Rehabil,Chicago, v.91, p.1447-1451, Sep. 2010.

KELLGREN JH, LAWRENCE JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. Ann Rheum Dis, London, v.16, n.4, p.494-502, Dec. 1957.

KEVIN R. VINCENT, BRYAN P. CONRAD, BENJAMIN J. FREGLY, HEATHER K. VINCENT. The pathophysiology of osteoarthritis: A mechanical perspective on the knee joint. PM R, New York, v.4, n.50, supl.3–9, May, 2012.

KLEIN K, AESCHLIMANN A, JORDAN S, GAY R, GAY S, SPROTT H. ATP induced brain-derived neurotrophic factor expression and release from osteoarthritis synovial fibroblasts is mediated by purinergic receptor P2X4. PLos One, San Francisco, v.7, n.5, p.e36693, May. 2012

KLIMIUK PA, SIERAKOWSKI S, LATOSIEWICZ R, CYLWIK JP, CYLWIK B, SKOWRONSKI J, CHWIECKO J. Circulating tumour necrosis factor a and soluble tumour necrosis factor receptors in patients with different patterns of rheumatoid synovitis. Ann Rheum Dis, London, v62, p.472–475, May. 2003.

KNAEPEN K., GOEKINT M, HEYMAN E M, MEEUSEN R. Neuroplasticity – Exercise-Induced Response of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor. A Systematic Review of Experimental Studies in Human Subjects. Sports Med, Auckland, v.40, n.9, p.765-801, Sep. 2010.

KRABBE KS, PERDERSEN M, BRUUNSGAARD H. Inflammatory mediators in the elderly. Experimental Gerontology, Oxford, v.39, n.5, p.687-99, May. 2004.

KRAEMER WJ, RATAMESS NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med, Auckland, v.35, n.4, p.339-61, Apr. 2005.

KRAEMER, W.J.; FRENCH, D.N.; PAXTON, N.J.; HAKKINEN, K.; VOLEK, J.S.; SEBASTIANELLI, W.J.; PUTUKIAN, M.; NEWTON, R.U.; RUBIN, M.R.; GÓMEZ, A.L.; VESCOVI, J.D.; RATAMESS, N.A.; FLECK, S.J.; LYNCH, J.M.; KNUTTGEN, H.G. Changes in exercise performance and hormonal concentrations over a big ten soccer season in starters and nonstarters. Journal of Strength and Conditioning Research, Champaign, v.18, p.121-128, Feb. 2004.

KUETTNER KE, COLE AA. Cartilage degeneration in different human joints. Osteoarthritis Cartilage, London, v.13, n.2, p.93-103, Feb. 2005.

LAU RWK, LIAO LR, YU F, TEO T, CHUNG RC, PANG MYC. The effects of whole body vibration therapy on bone mineral density and leg muscle strength in older adults: a system review and meta-analysis. Clin Rehabil, London, v.25, n.11, p.975-88, Nov. 2011.

LEE, Y. C.; LU, B.; BATHON, J. M.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; SMITH, M. T.; PAGE, G. G.; EDWARDS, R. R. Pain Sensitivity and Pain Reactivity in Osteoarthritis. Arthritis Care Res, Hoboken, v.63, n.3, p.320–327, Mar. 2011.

LINDSAY RM. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. Neurobiol. Aging, New York, v.15, p.249–51, Mar-Apr. 1994.

LIVSHITS G, ZHAI G, HART DJ, KATO BS, WANG H, WILLIAMS FM, et al. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. Arthritis Rheum, Atlanta, v.60, n.7, p.2037-45, Jul. 2009.

LOESER RF, GOLDRING SR, SCANZELLO CR, GOLDRING MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. Arthritis & Rheumatism, Atlanta, v.64, n.6, p.1697-1707, Jun. 2012.

MADUREIRA MM, TAKAYAMA L, GALLINARO AL, CAPARBO VF, COSTA RA, PEREIRA RM. Balance training program is highly effective in improving functional status and reducing the risk of falls in elderly women with osteoporosis: a randomized controlled trial. Osteoporos Int, London, v.18, n.4, p.419-425, Apr. 2007.

MARX FC, OLIVEIRA LM, BELLINI CG, RIBEIRO MCC. Translation and cultural validation of the Lequesne's algofunctional questionnaire for osteoarthritis of knee and hip for portuguese language, Rev Bras Reumatol, São Paulo, v.46, p.253-60, Jul-Aug. 2006.

MATTHEWS VB, ASTRÖM MB, CHAN MH, BRUCE CR, KRABBE KS, PRELOVSEK O, AKERSTRÖM T, YFANTI C, BROHOLM C, MORTENSEN OH, PENKOWA M, HOJMAN P, ZANKARI A, WATT MJ, BRUUNSGAARD H, PEDERSEN BK, FEBRAIO MA. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. Diabetologica, Berlin, v.52, n.7, p.1409-418, Jul. 2009.

MBOUROU GA, LAJOIE Y, TEASDALE N. Step length variability at gait initiation in elderly fallers and non-fallers, and young adults. Gerontology. Basel, v.49, n.1, p.21-26, Jan- Feb. 2003.

McMURRAY RG, HACKNEY AC. Endocrine responses to exercise and training. In: Exercise and Sport Science. Eds: GARRET, WE, KIRKENDALL DT. Philadelphia: Linpponcott Willians & Wilkins. 135-156, 2000.

MCNAIR, P. J.; MARSHALL, R.N.; MAGUIRE, K. Swelling of the knee Joint: Effects of exercise on quadriceps muscle strenght. Arch Phys Medic Rehabil, Chicago, v.77, p.896-899, Sep. 1996.

MESTER J, SPITZENFEIL P, SCHWARZER J, SEIFRIZ F. Biological reaction to vibration--implications for sport. J Sci Med Sport, Belconnen, v.2, n.3, p.211-226, Oct. 1999.

MICHAEL JW-P, SCHLÜTER-BRUST KU, EYSEL P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. Dtsch Arzetebel Int, Cologne, v.107, p.152-62, Mar. 2010.

MILLER GD, NICKLAS BJ, LOESER RF. Inflammatory biomarkers and physical function in older, obese adults with knee pain and self-reported osteoarthritis after intensive weight-loss therapy. J Am Geriatr Soc, New York, v.56, n.4, p.644-51, Apr. 2008.

MINAYO, M. C. S. O envelhecimento da população brasileira e os desafios para o setor saúde. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.28, n.2, p.208-209, fev, 2012.

MIYAMOTO ST, LOMBARDI JUNIOR I, BERG KO, RAMOS LR, NATOUR J. Brazilian version of the Berg Balance Scale. Braz J Med Biol Res, Ribeirão Preto, v.7, p.1411-1421, Sep. 2004.

MONTERO-ODASSO M, SCHAPIRA M, SORIANO ER, VARELA M, KAPLAN R, CAMERA LA, et al. Gait velocity as a single predictor of adverse events in healthy seniors aged 75 years and older. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, Washington, v.60, n.10, p.1304-1309, Oct. 2005.

MOSMANN TR, SAD S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Review Immunology Today, Amsterdan, v.17, n.3, p.138-146, Mar. 1996.

NAZAROV V, SPIVAK G: Development of athlete's strength abilities by means of biomechanical stimulation method. Theory and Practice of Physical Culture, v.12, p.445-450, 1985.

NEVES CDC, TOSSIGE-GOMES R, AVELAR NCP et al. Assessing the reliability of isometric strength of knee extensors by using load cell. Ter Man. v.9, p.16-21, 2011.

PACÀK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocrine Reviews, Chevy Chase, v.22, p.502-48, Aug. 2001.

PARK YG, KWON BS, PARK JW, CHA DY, NAM KY, SIM KB, CHANG J, LEE HJ. Therapeutic effect of whole body vibration on chronic knee osteoarthritis. Ann Rehabil Med. Korea, v.37, n.4, p.505-515, Aug. 2013.

PENNINX BW, ABBAS H, AMBROSIUS W, NICKLAS BJ, DAVIS C, MESSIER SP, et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. J Rheumatol, Toronto, v.31, p.2027-231, Oct. 2004.

PETERSSON IF, SANDQVIST L, SVENSSON B, SAXNE T. Cartilage markers in synovial fluid in symptomatic knee osteoarthritis. Ann Rheum Dis, London, v.56 n.1, p.64-7, Jan. 1997.

PORTNEY LG, WATKINS M.P. Foundations of clinical research: applications to practice. 3rd ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, 2009.

RAUCH F, SIEVANEN H, BOONEN S, CARDINALE M, DEGENS H, FELSENBERG D, ROTH J, SCHOENAU E, VERSCHUEREN S, RITTWEGER J. Reporting whole-body vibration intervention studies: Recommendations of the International Society of Musculoskeletal and Neuronal Interactions. J Musculoskelet Neuronal Interact, Kifissia, v.10, n.3, p.193-198, Sep. 2010.

REES SS, MURPHY AJ, WATSFORD ML. Effects of whole body vibration exercise on lower-extremity muscle strength and power in an older population: a randomized clinical trial. Phys Ther, Albany, v.88, p.462-470, Apr. 2008.

RIHL M, KRUITHOF E, BARTHEL C, DE KEYSER F, VEYS EM, ZEIDLER H, YU DTY, KUIPERS JG, BAETEN D Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment. Ann Rheum Dis, London, v.64, p.1542-1549, Nov. 2005.

ROELANTS M, DELECLUSE C, VERSCHUEREN SM. Whole-body vibration training increases knee-extension strength and speed of movement in older women. J Am Geriatr Soc, New York, v.52, p.901-908, Jun. 2004.

ROMMERTS FFG. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and nongenomic actions. In: Testosterone Action-Deficiency-Substitution, 2nd edn (eds Nieschlag, E, Behre, HM) (1998), pp. 1–31. Springer Verlag, London.

ROSCHEL H, BARROSO R, BATISTA M, UGRINOWITSCH C, TRICOLI V, ARSATI F, LIMA-ARSATI YB, ARAÚJO VC, MOREIRA A. Do whole-body vibration exercise and resistance exercise modify concentrations of salivary cortisol and immunoglobulin A? Braz J Med Biol Res, Ribeirão Preto, v.44, p.592-97, Jun. 2011.

ROUX-LOMBARD P, PUNZI L, HASLER F, BAS S, TODESCO S, GALLATI H, GUERNE PA, DAYER JM. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. Arthritis Rheum, Atlanta, v.36, n.4, p.485-489, Apr. 1993.

SAKKAS LI, PLATSOUCAS CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Rheum, Atlanta, v.56, n.2, p.409-424, Feb. 2007.

SAKUMA K, YAMAGUCHI A. Review Article: The Recent Understanding of the Neurotrophin's Role in SkeletalMuscle Adaptation. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Akron, v.25, p.1-12, Jul. 2011.

SANTOS ML, GOMES WF, PEREIRA DS, OLIVEIRA DM, DIAS JM, FERRIOLI E, et al. Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA). Arch Gerontol Geriatr, Amsterdam, v.52, n.3, p.322 – 26, May-Jun. 2011.

SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Archives of General Psychiatry, Chicago, v.57, p.925-935, Oct. 2000.

SAY KG. Associação entre a presença de citocinas, medidas morfológicas articulares e controle sensório-motor de indivíduos portadores de osteoartrite grau I e II [Tese]. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SCHIPHOP D, DE KLERK BM, KOES BW, BIERMA-ZEINSTRA S. Good reliability, questionable validity of 25 different classification criteria of knee osteoarthritis: a systematic appraisal. J Clin Epidemiol, Oxford, v.61, n.12, p.1205-1215, Dec. 2008.

SHARMA, L. CAHUE, S. SONG, J. HAYES, K. PAI, Y. C. DUNLOP D. Physical Functioning Over Three Years in Knee Osteoarthritis: Role of Psychosocial, Local Mechanical, and Neuromuscular Factors. Arthritis & Rheumatism, Atlanta, v.48, n.12, p.3359–3370, Dec. 2003.

SRIKANTH VK, FRYER JL, ZHAL G, WINZENBERG TM, HOSMER D, JONES G. A metaanalysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. Osteoarthr Cartilage, London, v.13, p.769-81, Sep. 2005.

STEFFEN TM, HACKER TA, MOLLINGER L. Age- and gender-related test performance in community-dwelling elderly people: Six-Minute Walk Test, Berg Balance Scale, Timed Up & Go Test, and gait speeds. Phys Ther, Albany, v.82, p.128-137, Feb. 2002.

STEINER G, STUDNICKA-BENKE A, WITZMANN G, HOFLER E, SMOLEN J. Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis and osteoarthritis. J Rheumatol, Toronto, v.22, p.406-412, Mar. 1995.

TAKEBAYASHI N, MAESHIMA H, BABA H, NAKANO Y, SATOMURA E, KITA Y, NAMEKAWA Y, NOMOTO H, SUZUKI T, ARAI H. Duration of last depressive episode may influence serum BDNF levels in remitted patients with major depression. Depress Anxiety, New York, v.29, n.9, p.775-779, Sep. 2012.

TEICHTAHL AJ, WLUKA AE, PROIETTO J, CICUTTINI FM. Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. Med Hypotheses, New York, v.65, n.2, p.312-315, Feb. 2005.

TRANS T, AABOE J, HENRIKSEN M, CHRISTENSEN R, BLIDDAL H, LUND H. Effect of whole body vibration exercise on muscle strength and proprioception in females with knee osteoarthritis. Knee, Oxford, v.16, p.256-61, Aug. 2009.

TSUCHIDA AI, BEEKHUIZEN M, RUTGERS M, VAN OSCH GJ, BEKKERS JE, BOT AG, GEURTS B, DHERT WJ, SARIS DB, CREEMERS LB. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. Arthritis Res Ther. London, v.14, n.6, p.R262, Dec. 2012

TURAN B, PFISTER K, DIENER PA, HELL M, MÖLLER B, BOYVAT A, ERGIN S, VILLIGER PM. Soluble tumor necrosis factor receptors sTNFR1 and sTNFR2 are produced at sites of inflammation and are markers of arthritis activity in Behçet's disease. Scand J Rheumatol, Stockholm, v.37, p.135-141, Mar-Apr. 2008.

UCHIDA MC, BACURAU RFP, NAVARRO F, PONTES FLJR, TESSUTI VD, MOREAU RL, ROSA LFBPC, AOKI MS. Alteration of testosterone:cortisol ratio induced by resistance training in women. Rev Bras Med Esporte, Niterói, v.10, n.3, p.169-72, May-Jun. 2004.

UEHARA J, KUBOKI T, FUJISAWA T, KOJIMA S, MAEKAWA K, YATANI H. Soluble tumor necrosis factor receptors in synovial fluids from temporomandibular joints with painful anterior disc displacement without reduction and osteoarthritis. Archives of Oral Biology, Oxford, v.49, p.133-142, Feb. 2004.

VAN BAAR ME, DEKKER J, OOSTENDORP RA, BIJL D, VOORN TB, BIJLSMA JW. Effectiveness of exercise in patients with osteoarthritis of hip or knee: nine months' follow up. Ann Rheum Dis, London, v. 60, n. 12, p. 1123-1130, Dec. 2001.

VERAS, R.P., RAMOS, L.R.; KALACHE, A. Crescimento da população idosa no Brasil, transformações e conseqüências na sociedade. Revista Saúde Publica. São Paulo, v.21, p.225-233, Jun. 1987.

VERSCHUEREN SM, ROELANTS M, DELECLUSE C, SWINNEN S, VANDERSCHUEREN D, BOONEN S. Effect of 6- month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. J Bone Miner Res, New York, v.19, p.352-59, Mar. 2004.

VINA, J.; SANCHIS-GOMAR, F.; MARTINEZ-BELLO, V.; GOMEZ-CABRERA M. C. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. British Journal of Pharmacology. London, v.167, p.1-12, Sep. 2012.

WAETZIG GH, ROSENSTIEL P, ARLT A, TILL A, BRAUTIGAM K, SCHAFER H, ROSE-JOHN S, SEEGERT D, SCHREIBER S. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. FASEB J, Bethesda, v.19, n.1, p.91-93, Jan. 2005.

WANNMACHER L. Osteoartrose de joelhos Parte II: Evidências sobre abordagens não-medicamentosas. *Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados*. Brasília, v.3, n.4, p.1-6, Mar. 2006.

WARBURTON, D. E.; NICOL. C. W.; BREDIN., S. S. Health benefits of physical activity: the evidence. CMAJ. Ottawa, v. 174, n. 6, p. 801-809, Mar. 2006.

YAMASHIRO T, FUKUNAGA T, YAMASHITA K, KOBASHI N, TAKANO-YAMAMOTO T. Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. Bone, New York, v.28, p.404–409, Apr. 2001.

ZACARON KAM, DIAS JMD, ABREU NS, DIAS RC. Physical activity levels, pain and swelling and your relationships with knee muscle dysfunction in elderly people with osteoarthritis. Rev Bras Fisioter, São Carlos, v.10, p.279-84, Sep. 2006.

# 7. Anexos

*7.1 Anexo I – Aprovação Comitê de Ética* (Estudos 1 e 2)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

**Comitê de Ética em Pesquisa/CEP**

UFVJM

Ofício nº.141/08

Diamantina, 28 de outubro de 2008.

A Sua Senhoria, a Senhora
Profa. Ana Cristina Rodrigues Lacerda
Departamento de Fisioterapia - FCBS
UFVJM

Assunto: Parecer Consubstanciado nº. 001/08

Prezada Pesquisadora,

O projeto protocolado sob o registro provisório nº 001/08 e intitulado: "Efetividade do Treinamento de Vibração de Todo o Corpo no Desempenho Funcional de Idosos com Osteoartrite de Joelho", foi reavaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e, tendo em vista a apresentação das correções sugeridas por este Comitê e, portanto, a conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, recebeu o parecer **APROVADO**. Seu número de registro definitivo é 046/08.

O projeto propõe investigar o efeito do treinamento de vibração de todo corpo, por meio de uma plataforma oscilatória modelo FitVibe, em 30 idosos com osteoartrite de joelho. Trata-se de um estudo clínico, randomizado, duplo-cego, caso-controle contendo três grupos: experimental, placebo e controle. Os parâmetros analisados serão: força muscular; capacidade aeróbica; agilidade; equilíbrio corporal; controle de dor; funcionalidade; rigidez matinal e resposta imunológica.

Deverá ser apresentado relatório a este Comitê um ano após a aprovação do projeto.

Atenciosamente,

**Profª. M.Sc. Nádia Verônica Halboth**
**Coordenadora CEP/UFVJM**

*Nadia Veronica Halboth*
Coordenadora
CEP / UFVJM

Campi I e II - Reitoria - Diamantina - MG - Brasil
Rua da Glória - nº 187 - Centro - CEP: 39100-000 - Diamantina - MG - Brasil - PABX: (38) 3531-1811
Campus Avançado do Mucuri - Teófilo Otoni - MG - Brasil
Av. Dr. Luiz Boali Porto Salman - s/nº - Ipiranga - CEP: 39801-000 - Teófilo Otoni - MG - Brasil - PABX: (33) 3522-6037

30/11/08

## *7.2 Anexo II - Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index* (WOMAC)

**Instruções para os pacientes**

Nas seções A, B, e C as perguntas serão feitas da seguinte forma e você deverá respondê-las colocando um “X” em um dos quadrados.

Nota:
1. Se você colocar o “X” no quadrado da extrema esquerda, ou seja:

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐
Então você está indicando que você não tem dor.

2. Se você colocar o “X” no quadrado da extrema direita, ex:
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐
Então você está indicando que sua dor é muito intensa.

3. Por favor, observe:

Que quanto mais à direita você colocar o “X”, maior a dor que você está sentindo.
Que mais à esquerda você colocar o “X”, menor a dor que você está sentindo.
Favor não coloque o “X” fora dos quadrados.

Você será solicitado a indicar neste tipo de escala a intensidade da dor, rigidez ou incapacidade que você está sentindo. Por favor, lembre que quanto mais à direita você colocar o “X”, você está indicando que está sentindo maior dor, rigidez, ou incapacidade.

**SECÇÃO A**

**INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

As perguntas a seguir se referem a intensidade da dor que você está atualmente sentindo devido a artrite de seu joelho. Para cada situação, por favor, coloque a intensidade da dor que sentiu nas últimas 72 horas (por favor, marque suas respostas com um "X").

Pergunta: Qual a intensidade da sua dor?

1. Caminhando em um lugar plano.
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

2. Subindo ou descendo escadas.
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

3. A noite deitado na cama
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

4. Sentado-se ou deitado-se
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

5. Ficando de pé
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

**SECÇÃO B**

**INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

As perguntas a seguir se referem a intensidade da rigidez nas juntas (não dor), que você está atualmente sentindo devido a artrite de seu joelho. Para cada situação, por favor, coloque a intensidade da dor que sentiu nas últimas 72 horas (por favor, marque suas respostas com um "X").

1. Qual é a intensidade de sua rigidez logo após acordar de manhã?
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

2. Qual é a intensidade de sua rigidez após se sentar, se deitar ou repousar no decorrer do dia?
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

**SECÇÃO C**

**INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

As perguntas a seguir se referem a sua atividade física. Nós chamamos atividade física, sua capacidade de se movimentar e cuidar de você mesmo (a). Para cada uma das atividades a seguir, por favor, indique o grau de dificuldade que você está tendo devido à artrite em seu joelho durante as últimas 72 horas (por favor, marque suas respostas com um "X").

Pergunta: Qual o grau de dificuldade que você tem ao:

1. Descer escadas

Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

2. Subir escadas
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐
3. Levantar-se estando sentada
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

4. Ficar de pé
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

5. Abaixar-se para pegar algo
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

6. Andar no plano
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

7. Entrar e sair do carro
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

8. Ir fazer compras
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

9. Colocar meias
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

10. Levantar-se da cama
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

11. Tirar as meias
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

12. Ficar deitado na cama
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

13. Entrar e sair do banho
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

14. Se sentar
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

15. Sentar e levantar do vaso sanitário
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

16. Fazer tarefas domésticas pesadas
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

17. Fazer tarefas domésticas leves
Nenhuma ☐ Pouca ☐ Moderada ☐ Intensa ☐ Muito intensa ☐

**OBRIGADO POR COMPLETAR ESTE QUESTIONÁRIO**

*7.3 ANEXO III - Escala de Equilíbrio de Berg*

Este teste é constituído por uma escala de 14 tarefas comuns que envolvem o equilíbrio estático e dinâmico tais como alcançar, girar, transferir-se, permanecer em pé e levantar-se. A realização das tarefas é avaliada através de observação e a pontuação varia de 0 – 4 totalizando um máximo de 56 pontos. Estes pontos devem ser subtraídos caso o tempo ou a distância não sejam atingidos, o sujeito necessite de supervisão para a execução da tarefa, ou se o sujeito apóia-se num suporte externo ou recebe ajuda do examinador. De acordo com Shumway-Cook & Woollacott (2003), na amplitude de 56 a 54, cada ponto a menos é associado a um aumento de 3 a 4% abaixo no risco de quedas, de 54 a 46 a alteração de um ponto é associada a um aumento de 6 a 8% de chances, sendo que abaixo de 36 pontos o risco de quedas é quase de 100%.

| DESCRIÇÃO DOS ITENS | Pontuação (0-4) |
|---|---|
| 1. Sentado para em pé | _____ |
| 2. Em pé sem apoio | _____ |
| 3. Sentado sem apoio | _____ |
| 4. Em pé para sentado | _____ |
| 5. Transferências | _____ |
| 6. Em pé com os olhos fechados | _____ |
| 7. Em pé com os pés juntos | _____ |
| 8. Reclinar à frente com os braços estendidos | _____ |
| 9. Apanhar objeto do chão | _____ |
| 10. Virando-se para olhar para trás | _____ |
| 11. Girando 360 graus | _____ |
| 12. Colocar os pés alternadamente sobre um banco | _____ |
| 13. Em pé com um pé em frente ao outro | _____ |
| 14. Em pé apoiado em um dos pés | _____ |
| **TOTAL** | _____ |

**INSTRUÇÕES GERAIS**

- Demonstre cada tarefa e/ou instrua o sujeito da maneira em que está escrito abaixo. Quando reportar a pontuação, registre a categoria da resposta de menor pontuação relacionada a cada item.

- Na maioria dos itens pede-se ao sujeito manter uma dada posição por um tempo determinado. Progressivamente mais pontos são subtraídos caso o tempo ou a distância não sejam atingidos, caso o sujeito necessite de supervisão para a execução da tarefa, ou se o sujeito apóia-se num suporte externo ou recebe ajuda do examinador.

- É importante que se torne claro aos sujeitos que estes devem manter seus equilíbrios enquanto tentam executar a tarefa. A escolha de qual perna permanecerá como apoio e o alcance dos movimentos fica a cargo dos sujeitos. Julgamentos inadequados irão influenciar negativamente na performance e na pontuação.

- Os equipamentos necessários são um cronômetro (ou relógio comum com ponteiro dos segundos) e uma régua ou outro medidor de distância com fundos de escala de 5, 12,5 e 25cm. As cadeiras utilizadas durante os testes devem ser de altura razoável. Um degrau ou um banco (da altura de um degrau) pode ser utilizado para o item #12.

1. **SENTADO PARA EM PÉ**

- INSTRUÇÕES: Por favor, fique de pé. Tente não usar suas mãos como suporte.

( ) 4 capaz de permanecer em pé sem o auxílio das mãos e estabilizar de maneira independente

( ) 3 capaz de permanecer em pé independentemente usando as mãos

( ) 2 capaz de permanecer em pé usando as mão após várias tentativas

( ) 1 necessidade de ajuda mínima para ficar em pé ou estabilizar

( ) 0 necessidade de moderada ou máxima assistência para permanecer em pé

2. **EM PÉ SEM APOIO**

- INSTRUÇÕES: Por favor, fique de pé por dois minutos sem se segurar em nada.

( ) 4 capaz de permanecer em pé com segurança por 2 minutos

( ) 3 capaz de permanecer em pé durante 2 minutos com supervisão

( ) 2 capaz de permanecer em pé durante 30 segundos sem suporte

( ) 1 necessidade de várias tentativas para permanecer 30 segundos sem suporte

( ) 0 incapaz de permanecer em pé por 30 segundos sem assistência

- Se o sujeito é capaz de permanecer em pé por 2 minutos sem apoio, marque pontuação máxima na situação sentado sem suporte. Siga diretamente para o item #4.

3. **SENTADO SEM SUPORTE PARA AS COSTAS MAS COM OS PÉS APOIADOS SOBRE O CHÃO OU SOBRE UM BANCO**

- INSTRUÇÕES: Por favor, sente-se com os braços cruzados durante 2 minutos.

( ) 4 capaz de sentar com segurança por 2 minutos

( ) 3 capaz de sentar com por 2 minutos sob supervisão

( ) 2 capaz de sentar durante 30 segundos

( ) 1 capaz de sentar durante 10 segundos

( ) 0 incapaz de sentar sem suporte durante 10 segundos

4. **EM PÉ PARA SENTADO**

INSTRUÇÕES: Por favor, sente-se.

( ) 4 senta com segurança com o mínimo uso das mão

( ) 3 controla descida utilizando as mãos

( ) 2 apóia a parte posterior das pernas na cadeira para controlar a descida

( ) 1 senta independentemente mas apresenta descida descontrolada

( ) 0 necessita de ajuda para sentar

5. **TRANSFERÊNCIAS**

- INSTRUÇÕES: Pedir ao sujeito para passar de uma cadeira com descanso de braços para outra sem descanso de braços (ou uma cama)

( ) 4 capaz de passar com segurança com o mínimo uso das mãos

( ) 3 capaz de passar com segurança com uso das mãos evidente

( ) 2 capaz de passar com pistas verbais e/ou supervisão

( ) 1 necessidade de assistência de uma pessoa

( ) 0 necessidade de assistência de duas pessoas ou supervisão para segurança

6. **EM PÉ SEM SUPORTE COM OLHOS FECHADOS**

- INSTRUÇÕES: Por favor, feche os olhos e permaneça parado por 10 segundos

( ) 4 capaz de permanecer em pé com segurança por 10 segundos

( ) 3 capaz de permanecer em pé com segurança por 10 segundos com supervisão

( ) 2 capaz de permanecer em pé durante 3 segundos

( ) 1 incapaz de manter os olhos fechados por 3 segundos mas permanecer em pé

( ) 0 necessidade de ajuda para evitar queda

7. **EM PÉ SEM SUPORTE COM OS PÉS JUNTOS**

- INSTRUÇÕES: Por favor, mantenha os pés juntos e permaneça em pé sem se segurar

( ) 4 capaz de permanecer em pé com os pés juntos independentemente com segurança por 1 minuto

( ) 3 capaz de permanecer em pé com os pés juntos independentemente com segurança por 1 minuto, com supervisão

( ) 2 capaz de permanecer em pé com os pés juntos independentemente e se manter por 30 segundos

( ) 1 necessidade de ajuda para manter a posição mas capaz de ficar em pé por 15 segundos com os pés juntos

( ) 0 necessidade de ajuda para manter a posição mas incapaz de se manter por 15 segundos

8. **ALCANCE A FRENTE COM OS BRAÇOS EXTENDIDOS PERMANECENDO EM PÉ**

- INSTRUÇÕES: Mantenha os braços estendidos a 90 graus. Estenda os dedos e tente alcançar a maior distância possível. (o examinador coloca uma régua no final dos dedos quando os braços estão a 90 graus. Os dedos não devem tocar a régua enquanto executam a tarefa. A medida registrada é a distância que os dedos conseguem alcançar enquanto o sujeito está na máxima inclinação para frente possível. Se possível, pedir ao sujeito que execute a tarefa com os dois braços para evitar rotação do tronco.)

( ) 4 capaz de alcançar com confiabilidade acima de 25cm (10 polegadas)

( ) 3 capaz de alcançar acima de 12,5cm (5 polegadas)

( ) 2 capaz de alcançar acima de 5cm (2 polegadas)

( ) 1 capaz de alcançar mas com necessidade de supervisão

( ) 0 perda de equilíbrio durante as tentativas / necessidade de suporte externo

9. **APANHAR UM OBJETO DO CHÃO A PARTIR DA POSIÇÃO EM PÉ**

- INSTRUÇÕES: Pegar um sapato/chinelo localizado a frente de seus pés

( ) 4 capaz de apanhar o chinelo facilmente e com segurança

( ) 3 capaz de apanhar o chinelo mas necessita supervisão

( ) 2 incapaz de apanhar o chinelo mas alcança 2-5cm (1-2 polegadas) do chinelo e manter o equilíbrio de maneira independente

( ) 1 incapaz de apanhar e necessita supervisão enquanto tenta

( ) 0 incapaz de tentar / necessita assistência para evitar perda de equilíbrio ou queda

10. **EM PÉ, VIRAR E OLHAR PARA TRÁS SOBRE OS OMBROS DIREITO E ESQUERDO**

- INSTRUÇÕES: Virar e olhar para trás sobre o ombro esquerdo. Repetir para o direito. O examinador pode pegar um objeto para olhar e colocá-lo atrás do sujeito para encorajá-lo a realizar o giro.

( ) 4 olha para trás por ambos os lados com mudança de peso adequada

( ) 3 olha para trás por ambos por apenas um dos lados, o outro lado mostra menor mudança de peso

( ) 2 apenas vira para os dois lados mas mantém o equilíbrio

( ) 1 necessita de supervisão ao virar

( ) 0 necessita assistência para evitar perda de equilíbrio ou queda

11. **VIRAR EM 360 GRAUS**

- INSTRUÇÕES: Virar completamente fazendo um círculo completo. Pausa. Fazer o mesmo na outra direção.

( ) 4 capaz de virar 360 graus com segurança em 4 segundos ou menos

( ) 3 capaz de virar 360 graus com segurança para apenas um lado em 4 segundos ou menos

( ) 2 capaz de virar 360 graus com segurança mas lentamente

( ) 1 necessita de supervisão ou orientação verbal

( ) 0 necessita de assistência enquanto vira

12. **COLOCAR PÉS ALTERNADOS SOBRE DEDGRAU OU BANCO PERMANECENDO EM PÉ E SEM APOIO**

INSTRUÇÕES: Colocar cada pé alternadamente sobre o degrau/banco. Continuar até cada pé ter tocado o degrau/banco quatro vezes.

( ) 4 capaz de ficar em pé independentemente e com segurança e completar 8 passos em 20 segundos

( ) 3 capaz de ficar em pé independentemente e completar 8 passos em mais de 20 segundos

( ) 2 capaz de completar 4 passos sem ajuda mas com supervisão

( ) 1 capaz de completar mais de 2 passos necessitando de mínima assistência

( ) 0 necessita de assistência para prevenir queda / incapaz de tentar

13. **PERMANECER EM PÉ SEM APOIO COM OUTRO PÉ A FRENTE**

- INSTRUÇÕES: (DEMOSTRAR PARA O SUJEITO) Colocar um pé diretamente em frente do outro. Se você perceber que não pode colocar o pé diretamente na frente, tente dar um passo largo o suficiente para que o calcanhar de seu pé permaneça a frente do dedo de seu outro pé. (Para obter 3 pontos, o comprimento do passo poderá exceder o comprimento do outro pé e a largura da base de apoio pode se aproximar da posição normal de passo do sujeito).

( ) 4 capaz de posicionar o pé independentemente e manter por 30 segundos

( ) 3 capaz de posicionar o pé para frente do outro independentemente e manter por 30 segundos

( ) 2 capaz de dar um pequeno passo independentemente e manter por 30 segundos

( ) 1 necessidade de ajuda para dar o passo mas pode manter por 15 segundos

( ) 0 perda de equilíbrio enquanto dá o passo ou enquanto fica de pé

14. **PERMANECER EM PÉ APOIADO EM UMA PERNA**

- INSTRUÇÕES: Permaneça apoiado em uma perna o quanto você puder sem se apoiar

( ) 4 capaz de levantar a perna independentemente e manter por mais de 10 segundos

( ) 3 capaz de levantar a perna independentemente e manter entre 5 e 10 segundos

( ) 2 capaz de levantar a perna independentemente e manter por 3 segundos ou mais

( ) 1 tenta levantar a perna e é incapaz de manter 3 segundos, mas permanece em pé independentemente

( ) 0 incapaz de tentar ou precisa de assistência para evitar queda

**( ) PONTUAÇÃO TOTAL (máximo = 56)**

*7.4 Anexo IV – Aprovação Comitê de Ética* (Estudo 3)

| PARECER CONSUBSTANCIADO | Nº de protocolo no Comitê: 029/11 |
|---|---|
| ☐ PROJETO DE PESQUISA | |
| ☐ TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO | |

**I - Identificação:**

**Título do projeto**: Relação entre marcadores inflamatórios no líquido sinovial e no plasma em idosos com osteoartrite de joelho

Pesquisador responsável: Prof. Adriano Prado Simão - Mestre

**Instituição responsável pela realização:** UFVJM

**Instituição/Local onde se realizará**: Hospital Nossa Senhora da Saúde

**Área de Concentração**: Fisioterapia (diagnóstico)

**Data de entrada no CEP**: 17/06/11

**II - Objetivos:**

Investigar a relação entre as concentrações plasmáticas e no líquido sinovial de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNFα) e receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em idosos com OA de joelho.

**III- Sumário do projeto:**

**Descrição e caracterização da amostra**: 40 idosos com diagnósticó de OA de joelho que fazem parte da lista de pacientes de um médico ortopedista da cidade de Diamantina-MG, que já se encontram com indicação clínica de punção articular.

**Critérios de inclusão e exclusão**: Serão incluídos neste estudo aqueles que apresentarem: idade igual e superior a 60 anos; diagnóstico de osteoartrite em pelo menos um dos joelhos, baseado nos critérios clínicos e radiográficos do "American College of Rheumatology"[24], com classificação I, II, III ou IV nos graus classificatórios de Kelgreen and Lawrence[28]; independência para deambulação; sintomatologia para osteoartrite de joelho com escore igual ou superior a dois na escala análoga visual de dor (VAS); não relatar trauma recente nos joelhos (nos últimos 30 dias); não ter se submetido a tratamento fisioterapêutico ou qualquer outro procedimento de reabilitação, assim como, a procedimentos cirúrgicos nos últimos três meses, não ter feito uso de injeções de esteróides nos últimos 6 meses. Serão excluidos aqueles que apresentarem doenças reumatológicas, neurológicas, respiratórias ou cardíacas agudas que possam levar a alteração imunológica; também os pacientes que se auto-relatarem imunossuprimidos ou imunodeficientes, ou ainda que estejam em uso de medicação imunomoduladora.

**Adequação da metodologia**: Após aprovação pelo Comitê de Ética da UFVJM os participantes assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido. Inicialmente serão coletados os dados pessoais e sócio-demográficos na ficha de avaliação e, logo em seguida, os pacientes serão submetidos à aplicação do questionário WOMAC (Western Ontário and McMaster Universities Osteoarthritis Index). Após a coleta dos dados pessoais, sócio-demográficos e o preenchimento do questionário WOMAC serão realizadas as coletas de sangue venoso e líquido sinovial. As concentrações das citocinas e dos receptores solúveis no plasma e no líquido sinovial dos 40 voluntários serão mensuradas usando a técnica do ELISA sanduíche (R & D Systems). Primeiramente será realizado o teste para avaliar a normalidade dos dados sendo considerado o nível de significância de 5%. Caso seja encontrada uma normalidade dos dados os mesmos serão analisados pelo teste de correlação intraclasse de Pearson, em contrapartida se os dados apresentarem distribuição não normal utilizará o teste de correlação intraclasse de Spearman.

**Adequação das condições**: Adequadas.

**IV- Comentários do relator frente à Resolução 196/96 e complementares em particular sobre:**

**Justificativa do uso do placebo (caso haja)**: Não se aplica

**Justificativa da suspensão terapêutica (wash out)**: qualquer impedimento pessoal que o indivíduo apresente, uma vez que sua participação no estudo é de caráter voluntário. Além de violação de qualquer uma das diretrizes deste projeto.

**Estrutura do protocolo**: adequada

**Análise de riscos e benefícios**: Os voluntários serão informados antes da realização dos procedimentos que poderão sentir algum dolorimento na coleta, mas que tende a desaparecer em um curto espaço de tempo. Os quites de coleta são totalmente descartáveis e a incisão é mínima, minimizando os riscos referentes à infecção. Os benefícios incluem uma avaliação da dor, rigidez no joelho e da função física dos voluntários, assim como uma avaliação dos marcadores inflamatórios cujos resultados poderão ajudar profissionais da área de saúde a estruturarem de forma eficaz os programas de tratamentos em pacientes acometidos pela OA de joelho.

**Adequação do consentimento e forma de obtê-lo**: Após serem informados sobre os procedimentos do estudo e em relação ao sigilo todos os voluntários que concordarem em participar do estudo receberão o termo de consentimento livre e esclarecido. Após aprovação pelo Comitê de Ética da UFVJM os participantes assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

**Informação adequada quanto ao financiamento**: Laboratórios de Fisiologia do Exercício (LAFIEX) e de Imunologia (LABIMUNO), ambos localizados na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Diamantina/MG, que disponibilizarão todo o material de consumo e permanente necessários para a realização da pesquisa. Outros gastos necessários serão de fundo próprio dos pesquisadores.

**Lista de centros (para estudos multicêntricos):** não se aplica

Outros:

**V - Pendências**
**VI- Observações:**
**VII – Motivos da não aprovação**

**VIII- Parecer Consubstanciado do CEP:** *

[X] **APROVADO.** Receberá parecer e certificado do Comitê.

[ ] **PENDENTE**. Certificado do Comitê sujeito à resolução das pendências em tempo previsto.

[ ] **NÃO APROVADO.** Receberá apenas o parecer do CEP. Submeterá novo projeto ao Comitê.

Observações ao pesquisador:

**Para projetos aprovados**

1) Somente estará autorizado o início da pesquisa, após aprovação do protocolo pelo CEP.
2) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
3) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
4) O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
5) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
6) Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente, em 18/02/12 e, ao término do estudo, em 18/08/12. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

**IX- Data da reunião do CEP:** 18 de agosto de 2011.

Agnes Maria Gomes Murta

**Profª. Agnes Maria Gomes Murta, Ph.D.**
**Coordenadora do CEP UFVJM**

Profª Drª Agnes Maria Gomes Murta
Coordenadora CEP/UFVJM

**7.3 Artigo 1:**

Artigo publicado Archives of Physical Medicine and Rehabilitation

Fator de impacto: 2.358

Qualis Ciências Biológicas II: B1

ORIGINAL ARTICLE

# Functional Performance and Inflammatory Cytokines After Squat Exercises and Whole-Body Vibration in Elderly Individuals With Knee Osteoarthritis

*Adriano P. Simão, MSc, Núbia C. Avelar, MSc, Rosalina Tossige-Gomes, Camila D. Neves, Vanessa A. Mendonça, PhD, Aline S. Miranda, MSc, Mauro M. Teixeira, PhD, Antônio L. Teixeira, PhD, André P. Andrade, PhD, Cândido C. Coimbra, PhD, Ana Cristina Lacerda, PhD*

ABSTRACT. Simão AP, Avelar NC, Tossige-Gomes R, Neves CD, Mendonça VA, Miranda AS, Teixeira MM, Teixeira AL, Andrade AP, Coimbra CC, Lacerda AC. Functional performance and inflammatory cytokines after squat exercises and whole-body vibration in elderly individuals with knee osteoarthritis. Arch Phys Med Rehabil 2012;93:1692-1700.

**Objective:** To investigate the effects of squat exercises combined with whole-body vibration on the plasma concentration of inflammatory markers and the functional performance of elderly individuals with knee osteoarthritis (OA).

**Design:** Clinical, prospective, randomized, single-blinded study.

**Setting:** Exercise physiology laboratory.

**Participants:** Elderly subjects with knee OA (N=32) were divided into 3 groups: (1) squat exercises on a vibratory platform (platform group, n=11); (2) squat exercises without vibration (squat group, n=10); and (3) the control group (n=11).

**Interventions:** The structured program of squat exercises in the platform and squat groups was conducted 3 times per week, on alternate days, for 12 weeks.

**Main Outcome Measures:** Plasma soluble tumor necrosis factor-$\alpha$ receptors 1 (sTNFR1) and 2 (sTNFR2) were measured using immunoassays (the enzyme-linked immunosorbent assay method). The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index questionnaire was used to evaluate self-reported physical function, pain, and stiffness. The 6-minute walk test, the Berg Balance Scale, and gait speed were used to evaluate physical function.

**Results:** In the platform group, there were significant reductions in the plasma concentrations of the inflammatory markers sTNFR1 and sTNFR2 ($P<.001$ and $P<.05$, respectively) and self-reported pain ($P<.05$) compared with the control group, and there was an increase in balance ($P<.05$) and speed and distance walked ($P<.05$ and $P<.001$, respectively). In addition, the platform group walked faster than the squat group ($P<.01$).

**Conclusions:** The results suggest that whole-body vibration training improves self-perception of pain, balance, gait quality, and inflammatory markers in elderly subjects with knee OA.

**Key Words:** Cytokines; Osteoarthritis, knee; Rehabilitation; TNF receptors.

© *2012 by the American Congress of Rehabilitation Medicine*

OSTEOARTHRITIS (OA) IS a slow and progressive disease that is characterized by the degradation of articular cartilage and subchondral bone.[1,2] The degradation of articular knee cartilage in OA causes an inflammatory process (ie, the release of cytokines and the endogenous mediators of inflammatory reactions) that is responsible for the proteolytic digestion of articular cartilage.[3,4]

Studies have shown that OA is associated with high serum levels of inflammatory markers, including tumor necrosis factor-$\alpha$ (TNF-$\alpha$) and the soluble receptors of TNF-$\alpha$ (sTNFR1 and sTNFR2).[1,2,5] According to Penninx et al,[3] high levels of soluble TNF-$\alpha$ receptors were associated with decreased physical function, increased OA symptoms (eg, pain and stiffness), and worse radiographic scores in elderly, obese individuals with knee OA.

Although the process of articular cartilage degradation is considered to be irreversible, it is known that it can be stabilized or slowed with physical activities that build strength and proprioception in the lower limbs.[4,6,7] The greatest challenge of conservative OA treatment in the elderly is to find physical activities that act within the therapeutic window (ie, the load is high enough to be effective but not high enough to cause joint

**List of Abbreviations**

| | |
|---|---|
| BMI | body mass index |
| *g* | gravity |
| IL | interleukin |
| OA | osteoarthritis |
| sTNFR1 | soluble tumor necrosis factor-$\alpha$ receptor-1 |
| sTNFR2 | soluble tumor necrosis factor-$\alpha$ receptor-2 |
| sTNFRs | soluble receptors of tumor necrosis factor-$\alpha$ |
| TNF-$\alpha$ | tumor necrosis factor-$\alpha$ |
| TNFR1 | cell surface tumor necrosis factor-$\alpha$ receptor-1 |
| TNFR2 | cell surface tumor necrosis factor-$\alpha$ receptor-2 |
| WOMAC | Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index |

From the Exercise Physiology Laboratory, School of Health and Biological Sciences, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Diamantina, Minas Gerais (Simão, Avelar, Tossige-Gomes, Neves, Mendonça, Lacerda); Multicenter Post Graduation Program in Physiological Sciences, Brazilian Society of Physiology, São Paulo, Brazil (Simão, Avelar, Mendonça, Lacerda); Immunopharmacology Laboratory (Miranda, M.M. Teixeira, A.L. Teixeira) and Endocrinology Laboratory (Coimbra), Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais; and Physical Education School, Occupational Therapy and Physiotherapy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (Andrade), Brazil.

Supported by FAPEMIG, CNPq, and CAPES.

No commercial party having a direct financial interest in the results of the research supporting this article has or will confer a benefit on the authors or on any organization with which the authors are associated.

Clinical Trial Registration No.: ACTRN12610000475044.

Reprint requests to Ana Cristina R. Lacerda, PhD, School of Health and Biological Sciences, Exercise Physiology Laboratory, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Gloria's St #187, DownTown, 39100-000 Diamantina, Minas Gerais, Brazil, e-mail: *lacerda.acr@ufvjm.edu.br*.

In-press corrected proof published online on Jun 15, 2012, at www.archives-pmr.org.

0003-9993/12/9310-01044$36.00/0

http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2012.04.017

deterioration). Within this perspective, whole-body vibration training has been recommended as an efficient and safe tool for building muscle strength[8,9] and proprioception[8] in older women with knee OA.[10] Whole-body vibration training is achieved on a vibratory platform, and the amplitude is varied while the patient is either positioned orthostatically or performing dynamic movements (eg, squats with unipedal or bipedal support, or plantar flexion movements with feet supported over the platform).[11,12]

There is a gap in the literature concerning the capacity of whole-body vibration training to minimize inflammatory components or to prevent functional decline and disease progression in elderly individuals with knee OA. The purpose of this study was to investigate the effects of squat exercises combined with whole-body vibration on the plasma concentration of inflammatory markers and the functional performance of elderly individuals with knee OA. Because the vibratory stimulus strengthens the lower limbs[8,9] and improves proprioception[8] in elderly patients with knee OA by inducing isometric, concentric, and eccentric contractions of the hip and knee extensor muscle groups and the plantar flexors, it was hypothesized that the subjects in the platform group, which involved squat exercise training along with whole-body vibration, would have better control and execution of functional movements, such as those required for balance and gait performance, compared with the control (which did not receive training) and the squat (which involved squat exercise training without whole-body vibration) groups. In addition, the combination of squat exercises and whole-body vibration would improve the stability of the knee affected by OA by reducing the inflammatory joint process and, consequently, the self-perception of pain.

## METHODS

This prospective, randomized, single-blinded study assessed variables immediately before and after a 12-week training program. For the allocation of participants, a 1:1 ratio randomization was performed using opaque envelopes for the concealment of allocation. To minimize the chance of bias, opaque, sealed, and serial-numbered envelopes were used that were opened sequentially (only after the participant's name and further details were written on the envelope) and kept in a locked, secure place. The allocation sequence was concealed from the researcher who enrolled and assessed participants. Only 1 researcher was aware of the group assignments when performing the randomization. This study was approved by the Scientific Ethics Committee of the Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (protocol n° 001/08).

To participate in the study, patients had to be 60 years or older and have a diagnosis of OA in at least 1 knee based on the clinical and radiographic criteria of the American College of Rheumatology[13]: (1) knee pain for most of the days in the previous month; (2) osteophytes at the joint margins on radiographs; (3) synovial fluid typical of OA (laboratory); (4) age 40 years or older; (5) crepitus on active joint motion; and (6) morning stiffness lasting 30 minutes or less. The subjects could only receive a diagnosis of knee OA if the following American College of Rheumatology criteria were present: criteria 1 and 2; criteria 1, 3, 5, and 6; or criteria 1, 4, 5, and 6.

The severity of the knee OA was classified radiographically according to the Kellgren-Lawrence scale (grades 0–4: 0, normal; 4, severe OA). Grade 2 (definite osteophytes and possible narrowing of the joint space) was used as a cutoff to classify knee OA.[14,15] Exclusion criteria were the following: (1) recent knee trauma; (2) use of any device to assist locomotion (eg, walking sticks, crutches, walkers); (3) physiotherapy treatment or any other rehabilitation procedure in the last 3 months; (4) the absence of the minimum clinical and cognitive conditions for performing physical activities; and (5) use of glucocorticoids for at least 2 months before beginning the study. Patients were also excluded if they had the following: orthopedic disease; neurologic, respiratory, or acute cardiac issues that prevented the performance of the required exercises; vestibular disorders; immunosuppression or immunodeficiency; lack of sphincter control (anal and bladder); or cognitive deficits, as determined by a lower score on the Mini-Mental State Examination than obtained by other patients with the same education level.[16] This examination consists of 6 categories, which include memory, spatial orientation, temporal orientation, judgment, problem solving, and reasoning. Each category is scored from 0 to 3. The sum of the scores obtained in each category is determined, and higher scores signify lower cognitive impairment. The cutoff point was 13 for illiterate subjects, 18 for subjects with 1 to 3 years of education, 23 for subjects with 4 to 7 years of education, and 26 for subjects with more than 7 years of education.

A total of 125 elderly patients were evaluated, and 35 (4 men, 31 women) met the criteria for inclusion and participated in the research. Once included in the study, volunteers were randomly distributed into 1 of 3 groups: the platform group (n=12), which involved squat exercise training along with whole-body vibration; the squat group (n=11), which involved squat exercise training without whole-body vibration; and the control group (n=12), in which the members did not receive training and were instructed not to change their lifestyle during the study or engage in any new type of physical activity. To ensure the maintenance of patients in the control group, weekly phone calls were made to each group member to confirm his/her routine activities. Thirty-two of the 35 elderly individuals completed the study and were reassessed after the 12-week training period (fig 1).

### Procedures

Clinical and demographic data related to the participants were initially collected, and all study patients (platform, squat, and control groups) underwent a clinical evaluation and blood sample collection before the initiation of the 12-week interven-

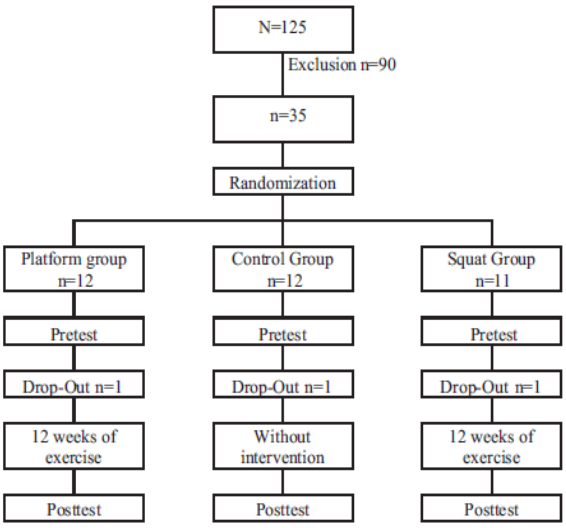



**Fig 1. Study flowchart. Pretest and posttest correspond to the periods immediately before and after the training, respectively.**

tion program for the platform and squat groups. The blood draws were always collected at 8 AM for the volunteers of all the groups, followed by the clinical tests. At the end of the training period, the volunteers of the 3 groups were reassessed.

The structured program of squat exercises in the platform and squat groups was conducted 3 times per week, on alternate days, for 12 weeks. The squat exercise was performed starting at approximately 10° of knee flexion and continuing until 60° of knee flexion was reached. For each volunteer, a knee angle of 60° was measured before the series of exercises, and a barrier was imposed on the buttocks to limit the degree of knee flexion.

For temporal control during the squat, an examiner provided verbal encouragement to standardize the length of maintaining the semifull position (3s) and the flexed position (3s of isometric contraction) of the knees in each squat repetition. In addition, a predetermined distance from the feet (14cm to the right and 14cm to the left of the vibration center of the platform) was set to ensure that each of the lower limbs received the same amount of vibration stimulus. Moreover, with the aim of maintaining control of the body's center of gravity behind the base of the support, the positioning of the spine, arms, and head and the type of squat (simulating the motion of sitting in a chair) were standardized.

The platform group subjects received a vertical sinusoidal vibration at a preestablished frequency (FitVibe[a]).

The parameters of the vibration in the platform group were based on the principles of training load progression: the frequency was varied from 35 to 40Hz, the amplitude was 4mm, and the acceleration ranged from 2.78 to 3.26*g*. The choice of vibratory frequencies and the amplitude were set in order to obtain an acceleration range between 2 and 5*g* (gravity), which was suggested to be sufficient by Delecluse et al[12] for achieving the desired physiologic effects. Before the data collection, the acceleration values of the platform were measured using the accelerometer Mega[b] (ZPP1-3D-BC The Acceleration Measuring Kit).

The volume of the squat training for the squat and platform groups was increased systematically during the 12-week intervention by increasing the time and number of sets and reducing the rest time (table 1). For patients in the platform group, the vibration acceleration was also increased by varying the vibratory frequency (35–40Hz).[10,11,17,18] The protocol was designed in accordance with the International Organization for Standardization 2631-1 guidelines for the prescription of training intensity, in which the ideal parameters of frequency, amplitude, and time of exposure to whole-body vibration are defined based on the acceleration values.[19] In addition, an effort was made to use training parameters that were similar to the parameters implemented in previous studies.[10,11,20]

Before the squat exercise, the intervention groups (squat and platform) warmed up on exercise bikes[c] for 10 uninterrupted minutes at 70% of maximum cardiac frequency, which was predicted for age and was monitored with a cardiofrequency meter (Polar model F4[d]).

### Analysis of Inflammatory Markers With Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

For plasma processing, 10-mL blood samples were collected from the antecubital vein using aseptic technique and heparin as an anticoagulant. The blood was immediately centrifuged twice at 3.000*g* for 10 minutes, and the plasma was kept frozen at –70°C until assayed. Plasma sTNFR1 and sTNFR2 levels were measured according to the procedures supplied by the manufacturer and using ELISA kits for sTNFR1 and sTNFR2 (DuoSet[e]). The detection limit was 5pg/mL for both soluble receptors.

### Radiographic Evaluation

To confirm the diagnosis of knee OA, digital radiographic evaluations were performed on all participants. Anteroposterior oblique and lateral images of the knees were collected with subjects in the orthostatic position bearing weight on the lower limbs.[21] The radiologic classification of OA severity, which was based on the Kellgren-Lawrence scale,[14] was performed by 2 examiners who were blinded to the clinical status of the participants. There was 100% agreement on the assessments of radiographic images by the examiners.

### Clinical Tests

In all cases, the clinical tests were administered by the same examiner who was blinded to the group assignments of the participants. The order of testing was always the same for the physical function tests both before and after the intervention period.

***Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index.*** Self-reported functional performance was evaluated using the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), validated for Brazilian popula-

**Table 1: Progression of Training in Platform and Squat Groups**

| Weeks | Parameters of the Vibration* | | | Time (s)/No. of Series of the Squat† | Rest Time Between Series (s)† |
|---|---|---|---|---|---|
| | Frequency of Vibration (Hz) | Vibration Amplitude (mm) | Acceleration (*g*) | | |
| 1 | 35 | 4 | 2 | 20/6 | 20 |
| 2 | 35 | 4 | 2 | 20/6 | 20 |
| 3 | 35 | 4 | 2 | 25/7 | 25 |
| 4 | 35 | 4 | 2 | 30/8 | 25 |
| 5 | 35 | 4 | 2 | 30/8 | 30 |
| 6 | 35 | 4 | 2 | 40/8 | 30 |
| 7 | 40 | 4 | 2.61 | 40/8 | 40 |
| 8 | 40 | 4 | 2.61 | 40/8 | 40 |
| 9 | 40 | 4 | 2.61 | 40/8 | 30 |
| 10 | 40 | 4 | 2.61 | 40/8 | 30 |
| 11 | 40 | 4 | 2.61 | 40/8 | 25 |
| 12 | 40 | 4 | 2.61 | 40/8 | 25 |

*Only for platform group.
†Platform and squat groups.

tions.[22] The WOMAC, which is composed of 24 items, was developed to measure health status and assess a patient's self-perception of pain (5 questions), joint stiffness (2 questions), and functional performance (17 questions) during the previous 72 hours. The WOMAC score was presented on a Likert-type scale where questions received a score of 0, 25, 50, 75, or 100 for no pain, a little pain, moderate pain, intense pain, and very intense pain, respectively.[23]

***Functional performance tests.*** Before the functional performance tests, the participants were instructed to use the bathroom, dress in comfortable clothing and shoes, drink 500 mL of water, eat a light meal, and avoid arduous activity for at least 2 hours.

Functional performance was evaluated based on the Berg Balance Scale,[24,25] the gait speed test, and the 6-minute walk test.[21] All tests were performed on the same day, and the WOMAC questionnaire was administered before the tests. There was a 5-minute break between each functional performance test.

*Berg Balance Scale.* The Berg Balance Scale evaluates balance using 14 tasks that involve static and dynamic balance (ie, reach, turn, transfer, remain standing, and get up).[24] Performance was evaluated by direct observation, and scores ranged from 0 (unable to perform the task) to 4 (performs the task independently), with a maximum of 56 points. A score below 45 indicates poor balance.[24,25]

*Gait speed test.* To evaluate gait speed, individuals were instructed to walk at a normal pace along a 10-m route. The first 2m and the last 2m were not evaluated because they were considered to correspond to acceleration and deceleration periods. Thus, the time required to complete the middle 6m was measured. The average time of 3 trials was used to calculate the gait speed in meters per second.[26]

*Six-minute walk test.* The objective of the 6-minute walk test was to evaluate walking function. This test measures the greatest distance that the individual is able to walk in 6 minutes. On hearing a standardized verbal command, the individual walked as fast as possible (without running) from one end of the route to the other. After 6 minutes, the individual being evaluated was instructed to stop, and the distance traveled was recorded. Two tests were performed with an interval of at least 15 minutes between tests.[27,28]

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with Prism 4.0 software.[f] The normality of the data distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test.

Nonparametric tests were used for the outcome analysis. The analysis between the groups was performed through variation ($\Delta$) within each group, where postvalue – prevalue = $\Delta$ value.

The sample characterization data were normally distributed and are presented as the mean and SD.

The inflammatory markers and physical performance data were not normally distributed and are presented as the median and interquartile range. To evaluate the baseline and $\Delta$ value differences between groups, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test was used for all the variables. The statistical significance was set at $P<.05$.

***Sample size.*** Sample size was calculated according to the gait speed test. The gait speed test evaluates the ability of subjects to increase or decrease their walking speed above or below a "comfortable" pace, which can vary depending on the environment and task demands (eg, crossing streets and avoiding obstacles). To calculate the sample size, SD of .22 (obtained from the article by Penninx[3]), a minimum difference of 0.5m/s between the groups, a significance level of 99%, and a statistical power of 80% were considered. As a result, the minimum number of subjects for each study group needed to be 5 participants. To compensate for possible losses in the study, 10% was added to this sample size for a total of 6 participants for each group.

The following formula was used to calculate the sample size required for the gait speed test (comparison of quantitative measures between different groups):

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

where $Z\alpha$ is the critical value to avoid a type I error (99% significance level) = 2.575; $Z\beta$ is the critical value to avoid a type II error (80% statistical power) = .84; $dp^2$ is the SD for the gait speed, obtained from Penninx[3]; and d is the minimum difference to be detected between groups (0.5m/s in the gait speed).

For the biomarkers studied (sTNFR1, sTNFR2), the statistical power of the study was calculated from the results of the effect size of the $\Delta$ values obtained from the comparisons before and after training.[29,30] A comparison between the control and platform groups demonstrated that the magnitude of the effect was high for both sTNFR1 (Cohen's $d$=2.19) and sTNFR2 (Cohen's $d$=1.37), indicating that the study has a statistical power above 84% for these variables, and the minimum sample size to obtain a statistical power of 80% would be 7 individuals per group.[31]

The following formula was used to calculate the effect size (Cohen[29]):

$$d = (X_1 - X_2)/S'$$

where $X_1$ = the mean of the result of the first group; $X_2$ = the

**Table 2: Sample Characterization**

| Characteristics | Control Group (n= 11) | | | Squat Group (n=10) | | | Platform Group (n=10) | | | P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Age (y) | | 71±5.3 | | | 69±3.7 | | | 75±7.4 | | .063 |
| Body mass (kg) | | 65.1±10.5 | | | 73.4±9.7 | | | 74.2±10.7 | | .371 |
| Height (m) | | 1.56±0.07 | | | 1.57±0.08 | | | 1.56±0.05 | | .935 |
| BMI (kg/m²) | | 26.7±2.74 | | | 29.8±2.53 | | | 27.4±9.7 | | .456 |
| Sex: M/W (%) | | 9/91 | | | 10/90 | | | 18/82 | | NA |
| Severity of | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | NA |
| knee OA* (%) | 46 | 27 | 27 | 50 | 10 | 40 | 20 | 30 | 50 | |

NOTE. Values are mean ± SD or as otherwise indicated.
Abbreviations: M, men; NA, not applicable W, women.
*Classified radiographically according to Kellgren-Lawrence scale.[14]

mean of the result of the second group; and S' = the common SD, which was calculated from the SD of the 2 groups.

## RESULTS

The characteristics of the sample population are shown in table 2. There were no significant differences in age, sex distribution, body height or weight, body mass index (BMI), or the OA grade among the 3 groups ($P>.05$), which confirmed the baseline homogeneity of the groups. The average age of the participants was 72 years, and the mean BMI was 28.7kg/m$^2$. Most of the sample (87.5%) were women.

All participants in both intervention groups complied with the full intervention program. The overall attendance was 99.7% in the platform group and 98.6% in the squat group. There was no statistically significant difference between the groups with respect to compliance ($P<.05$).

The pretest and posttest values from the physical-functional evaluation and the plasma concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 are shown in table 3.

The variation (Δ) in the plasma concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 showed a significant reduction in the platform group compared with the control group ($P<.01$ and $P<.05$, respectively) (fig 2).

The data from the physical-functional evaluation, which were analyzed through variations in postintervention and preintervention (Δ) results, showed significant differences between the control and platform groups for self-reported pain (WOMAC: $P<.05$), balance (Berg Balance Scale: $P<.05$), and gait performance, which was evaluated by the gait speed and 6-minute walk tests ($P<.05$ and $P<.001$, respectively). Interestingly, the gait speed in the platform group was faster than in the squat group ($P<.01$) after training (fig 3).

With respect to the baseline values of the 3 groups, the statistical analysis (Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test) did not show any significant differences for all the variables (table 3).

Table 4 gives the post hoc test (Δ values) results from the performance evaluation and the plasma concentrations of sTNFR1 and sTNFR2.

## DISCUSSION

The results of this study showed that the addition of vibration to squat exercise training improved gait performance and static and dynamic balance and decreased biomarkers and self-perception of pain in elderly patients with knee OA.

The addition of whole-body vibration to squat exercise training generates vertical sinusoidal vibrations that stimulate the primary endings of the muscle spindles, activating $\alpha$-motor neurons that result in muscle contractions that are comparable to the tonic vibration reflex.[10] As a result, the vibration stimulus strengthens the lower limbs[8,9] and improves proprioception[8] in elderly patients with knee OA by inducing isometric, concentric, and eccentric contractions of the hip and knee extensor muscle groups and the plantar flexors, thereby improving the control and execution of functional movements such as those required for static and dynamic balance and gait performance. As a consequence, whole-body vibration may be useful to stabilize and/or minimize the symptoms and consequences of knee OA in elderly patients by reducing the inflammatory joint process and the self-perception of pain.

The present study observed that the addition of whole-body vibration to squat exercise training improved the gait performance of the subjects, as evaluated by the gait speed and the distance walked. Although no studies have investigated the distance walked in elderly individuals with OA

**Table 3: Values Pretest and Posttest From the Performance Evaluation and Plasma Concentrations of sTNFR1 and sTNFR2**

| Variables | Control Group (n=12) | | | Squat Group (n=11) | | | Platform Group (n=12) | | | Baseline |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Pretest | Posttest | Δ | Pretest | Posttest | Δ | Pretest | Posttest | Δ | P |
| sTNFR1 (pg/mL) | 682.8 (617–849) | 1072.0 (879–1252) | 389.2 (102 to 638) | 722.4 (522–1052) | 742.5 (373–1492) | 155.0 (−720 to 536) | 1033.0 (718–1281) | 709.2 (379–1281) | −146.0 (−826 to 183) | .09 |
| sTNFR2 (pg/mL) | 3568.0 (3319–5002) | 4673.0 (3266–5371) | 35.4 (−1206 to 2104) | 4141.0 (3329–4993) | 3650.0 (2949–4719) | −497.7 (−1351 to 2219) | 4944.0 (3819–5862) | 3987.0 (2964–5067) | −996.5 (−1750 to 147.3) | .20 |
| Self-reported pain (score) | 175.0 (125–350) | 175.0 (100–250) | 0 (−125 to 125) | 275.0 (150–350) | 150.0 (75–250) | −62.5 (−325 to 75) | 312.5 (238–400) | 175.0 (75–275) | −137.5 (−200 to 0) | .20 |
| Self-reported stiffness (score) | 75 (50–100) | 75 (25.0–150) | 0 (−75 to 125) | 100 (37.5–125) | 50 (0–137.5) | −25 (−100 to 50) | 100 (75–137.5) | 75 (50–87.5) | −25 (−125 to 50) | .28 |
| Self-reported function (score) | 625 (525–675) | 650 (450–950) | 75 (−225 to 400) | 900 (737.5–1213) | 847.5 (387.5–1088) | −100 (−725 to 275) | 975 (600–1325) | 725 (350–1000) | −175 (−550 to 100) | .07 |
| Berg Balance Scale (score) | 51.0 (50–55) | 54.0 (51–56) | 0 (−2 to 5) | 53.5 (50–55) | 54.5 (53–56) | 1.5 (−1 to 4) | 48.0 (45–55) | 54.0 (52–56) | 4.5 (0 to 14) | .24 |
| 6-minute walk test (m) | 423.5 (384–443) | 430.0 (397–450) | 6 (−28 to 33) | 392.0 (361–454) | 410.6 (379–444) | 17.5 (−28 to 72) | 415.7 (377–488) | 438.0 (412–522) | 37.5 (−18 to 78) | .62 |
| Gait speed test (m/s) | 1.26 (1.12–1.41) | 1.33 (1.08–1.54) | 0.07 (−0.14 to 0.31) | 1.20 (1.13–1.47) | 1.38 (1.24–1.52) | 0.16 (−0.07 to 0.25) | 1.10 (0.99–1.28) | 1.37 (1.33–1.63) | 0.33 (0.23 to 0.42) | .31 |

NOTE. Values are median (interquartile range) or as otherwise indicated.

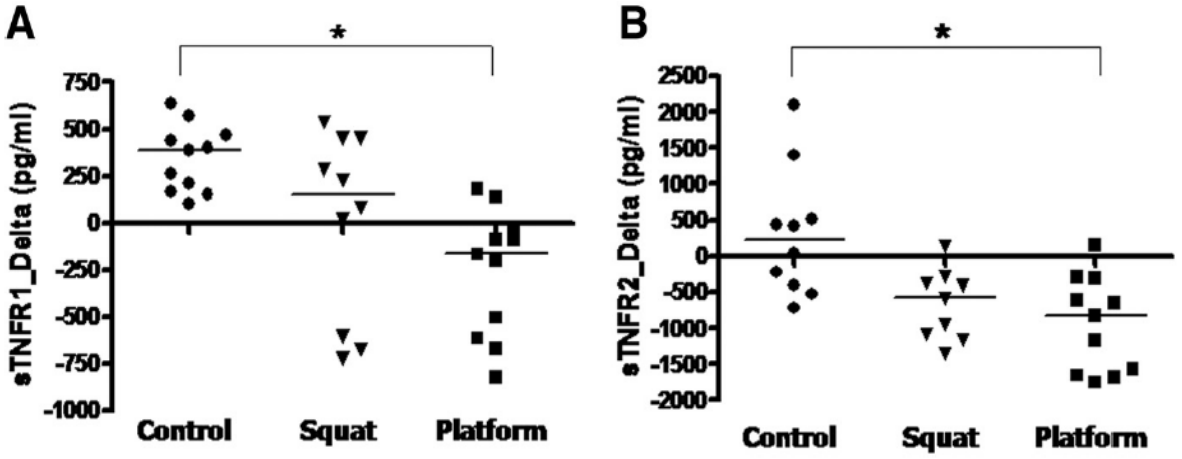



Fig 2. Variation of sTNFR1 (A) and sTNFR2 (B) plasma concentrations before and after the intervention period (delta = Δ). *Significant difference for platform group versus control group (*P*<.01 for sTNFR1 and *P*<.05 for sTNFR2).

after whole-body vibration training, improvements in gait speed have been observed in elderly individuals after a training program on a vibratory platform.[20] Moreover, several researchers[26,32] have suggested that balance improvements can positively influence gait speed in the elderly. Indeed, deteriorations in balance lead to an increased risk

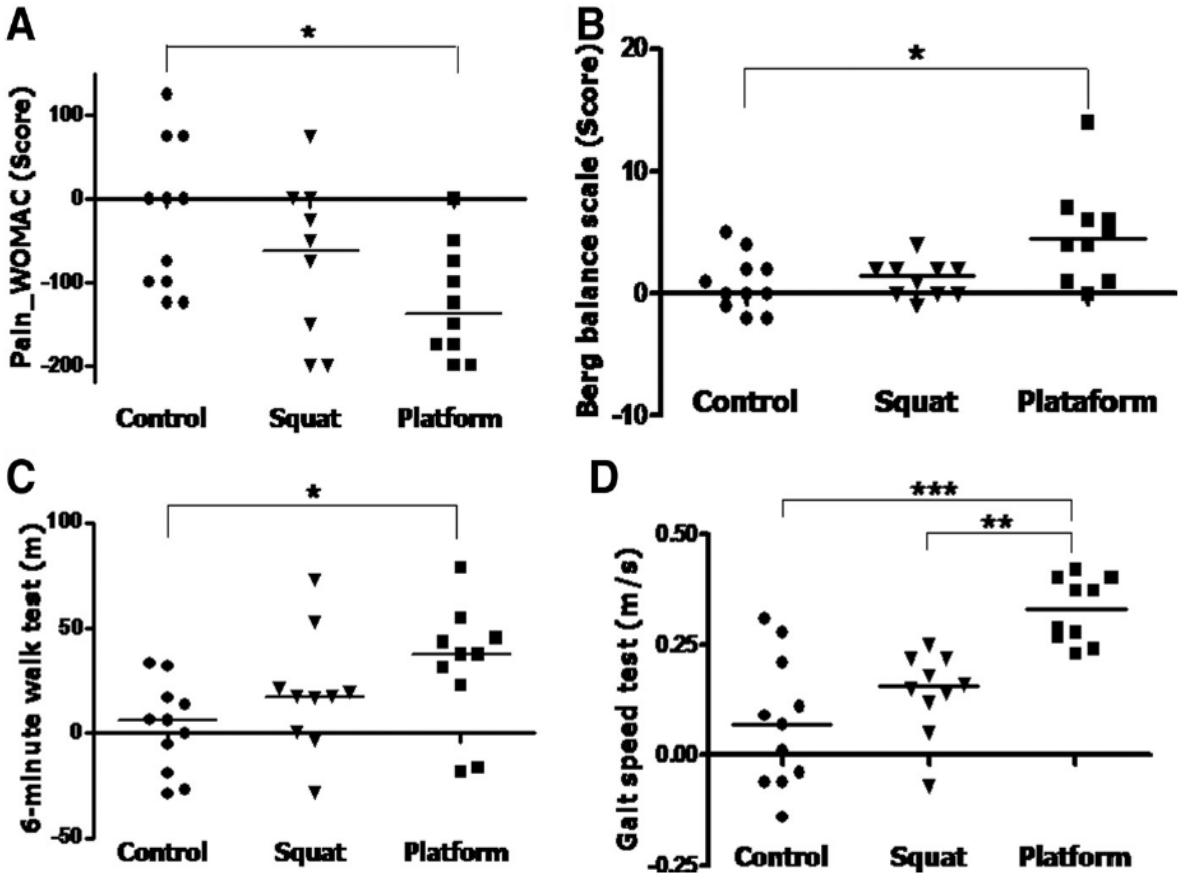



Fig 3. Variations of self-reported pain (A), balance, which was evaluated by the Berg Balance Scale (B), distance traveled in the 6-minute walk test (C), and gait speed (D) before and after the intervention period (Δ). **P*<.05 for platform group vs control group. ***P*<.01 for platform group vs squat group. ****P*<.001 for platform group vs control group.

Table 4: Post Hoc Test (Δ Values) From the Performance Evaluation and Plasma Concentrations of sTNFR1 and sTNFR2

| Variables | Dunn's Multiple Comparison Test | P |
|---|---|---|
| sTNFR1 (pg/mL) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | <.01 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| sTNFR2 (pg/mL) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | <.01 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| Self-reported pain (score) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | <.05 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| Self-reported stiffness (score) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | >.05 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| Self-reported function (score) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | >.05 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| Berg Balance Scale (score) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | <.05 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| 6-minute walk test (m) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | <.05 |
| | Squat vs platform | >.05 |
| Gait speed test (m/s) | Control vs squat | >.05 |
| | Control vs platform | <.001 |
| | Squat vs platform | <.01 |

for falls,[33,34] and elderly individuals compensate for their lack of balance by increasing the double-support phase of their gait, which decreases gait speed.[35]

As far as we know, there is no study that had evaluated the effect of vibration training on balance in elderly individuals with knee OA. However, Bautmans et al[36] used a randomized controlled trial to investigate the viability and impact of using whole-body vibration in institutionalized elderly individuals and observed a significant improvement in the balance of the group that trained on the vibratory platform compared with the placebo group.

A decrease in self-reported pain (WOMAC) was observed in the platform group compared with the control group, which is a finding that is consistent with the literature. Indeed, studies have shown a decrease in self-reported pain immediately after a training period.[37-39]

To our knowledge, this study was the first randomized study that investigated the effects of adding whole-body vibration to squat exercise training on the plasma concentrations of inflammatory markers in elderly individuals with knee OA. Compared with the control group, the plasma concentrations of the soluble receptors of TNF-α (sTNFRs) in the platform group were reduced, which coincided with improvements in static and dynamic balance, gait performance, and self-reported pain.

TNF-α is a potent cytokine that is predominantly proinflammatory and catabolic. Interestingly, TNF-α, which is primarily produced by stimulated phagocytes,[40] is involved in the initiation and progression of OA.[41,42] The intracellular signals for the response to TNF-α are mediated by 2 distinct species of cell surface receptors (ie, cell surface TNF-α receptors 1 [TNFR1] and 2 [TNFR2]), which bind TNF-α with high affinity. TNFR1 is expressed by most cell types, whereas TNFR2 is primarily expressed by hematopoietic cells and endothelial cells.[43] Both TNF-α receptors also exist in soluble forms (ie, sTNFR1 and sTNFR2). Interestingly, the cleavage of tumor necrosis factor receptors on the cell surface by TNF-α–converting enzyme results in appreciable serum levels of sTNFR1 and sTNFR2. These sTNFRs may compete with cell surface receptors and block TNF-α activity.[43,44] Because the sTNFRs can compete with the cell-associated tumor necrosis factor receptors for TNF-α, they have been suggested to function as inhibitors of TNF-α activity. It is important to emphasize that TNF-α is a proinflammatory cytokine that is very sensitive to subtle changes in endogenous glucocorticoid levels, such as circadian-mediated variations, and it has a rather short half-life. According to Kaneyama[45] and Cope[46] and colleagues, the expression of sTNFR1 and sTNFR2 reflects changes in the catabolic activity of TNF-α toward the cartilage matrix. Moreover, there is scientific evidence that the stimuli that increase cytokine concentrations may also induce increases in the production of soluble receptors, some of which decrease cytokine activity.[3] Because soluble receptors are generally more stable in the circulation than are cytokines,[3] they could potentially be more reliable markers of chronic inflammation. Given this possibility, it was hypothesized that the significant reduction in plasma concentrations of both sTNFR1 and sTNFR2 in the platform group compared with the control group could reflect a reduction in the inflammatory joint process of the knee.

Penninx[3] investigated the association between the serum concentrations of soluble markers (interleukin [IL]-6, C-reactive protein, TNF-α), and soluble receptors (soluble receptors of IL-6 and IL-2, sTNFR1, sTNFR2) and the functional performance and disease severity in elderly, obese individuals with knee OA. The results of the Penninx[3] study showed that particularly high levels of sTNFR1 and sTNFR2 were associated with a decrease in physical function, an increase in OA symptoms, and worse radiographic scores of the knee.

There were no significant differences between the squat and the control groups, even in the plasma concentrations of sTNFR1 and sTNFR2. It is believed that the subjects' own body mass overload during the training with squat exercises was not sufficient to promote improvements in the physical-functional evaluation tests used in the present study, or changes in the plasma concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 or the self-perception of pain. Interestingly, compared with the controls, the association of the squat with whole-body vibration stimulation was sufficient to induce significant alterations, which suggests that the whole-body vibration stimulus provided an additional overload to the squat exercise. Moreover, a comparison of the 3 groups showed a trend toward improvement for the platform group compared with the squat group in all of the analyzed variables. This finding was confirmed by the significant differences that were observed between the squat and platform groups in the gait speed test.

### Study Limitations

The addition of whole-body vibration to squat exercise training was designed to strengthen the lower limbs[9] in elderly patients with OA by inducing isometric, concentric, and eccentric contractions of the hip and knee extensor muscle groups and the plantar flexors. One limitation of the present results is that they cannot be extrapolated to other physical activity modalities. Other studies are necessary to evaluate the alterations in sTNFRs in other exercise modalities.

## CONCLUSIONS

The addition of vibration training to squat exercise training improves static and dynamic balance and gait perfor-

mance. Also, the addition of vibration training reduces the self-perception of pain and inflammatory markers in elderly patients with knee OA.

**Acknowledgments:** We thank the Santa Casa of Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

## References

1. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. Osteoarthritis Cartilage 2005;13:93-103.
2. Miller GD, Nicklas BJ, Loeser RF. Inflammatory biomarkers and physical function in older, obese adults with knee pain and self-reported osteoarthritis after intensive weight-loss therapy. J Am Geriatr Soc 2008;56:644-51.
3. Penninx BW, Abbas H, Ambrosius W, et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. J Rheumatol 2004;31:2027-31.
4. Englund M. The role of biomechanics in the initiation and progression of OA of the knee. Best Pract Res Clin Rheumatol 2010;24:39-46.
5. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology 2002;39:237-46.
6. Jan MH, Lin CH, Lin YF, Lin JJ, Lin DH. Effects of weight-bearing versus nonweight-bearing exercise on function, walking speed, and position sense in participants with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. Arch Phys Med Rehabil 2009;90:897-904.
7. Dunlop DD, Semanik P, Song J, et al. Moving to maintain function in knee osteoarthritis: evidence from the osteoarthritis initiative. Arch Phys Med Rehabil 2010;91:714-21.
8. Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. J Bone Miner Res 2004;19:352-9.
9. Roelants M, Delecluse C, Verschueren SM. Whole-body-vibration training increases knee-extension strength and speed of movement in older women. J Am Geriatr Soc 2004;52:901-8.
10. Trans T, Aaboe J, Henriksen M, Christensen R, Bliddal H, Lund H. Effect of whole body vibration exercise on muscle strength and proprioception in females with knee osteoarthritis. Knee 2009;16:256-61.
11. Bogaerts A, Verschueren S, Delecluse C, Claessens AL, Boonen S. Effects of whole body vibration training on postural control in older individuals: a 1 year randomized controlled trial. Gait Posture 2007;26:309-16.
12. Delecluse C, Roelants M, Verschueren S. Strength increase after whole-body vibration compared with resistance training. Med Sci Sports Exerc 2003;35:1033-41.
13. Hinton R, Moody RL, Davis AW, Thomas SF. Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. Am Fam Physician 2002;65:841-8.
14. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. Ann Rheum Dis 1957;16:494-502.
15. Schiphof D, de Klerk BM, Koes BW, Bierma-Zeinstra S. Good reliability, questionable validity of 25 different classification criteria of knee osteoarthritis: a systematic appraisal. J Clin Epidemiol 2008;61:1205-15.
16. Bertolucci PH, Brucki SM, Campacci SR, Juliano Y. [The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status] [Portuguese]. Arq Neuropsiquiatr 1994;52:1-7.
17. Rees SS, Murphy AJ, Watsford ML. Effects of whole body vibration on postural steadiness in an older population. J Sci Med Sport 2009;12:440-4.
18. Avelar NC, Simao AP, Tossige-Gomes R, et al. The effect of adding whole-body vibration to squat training on the functional performance and self-report of disease status in elderly patients with knee osteoarthritis: a randomized, controlled clinical study. J Altern Complement Med 2011;17:1149-55.
19. Griffin MJ. Minimum health and safety requirements for workers exposed to hand-transmitted vibration and whole-body vibration in the European Union; a review. Occup Environ Med 2004;61:387-97.
20. Kawanabe K, Kawashima A, Sashimoto I, Takeda T, Sato Y, Iwamoto J. Effect of whole-body vibration exercise and muscle strengthening, balance, and walking exercises on walking ability in the elderly. Keio J Med 2007;56:28-33.
21. Harada N, Chiu V, Damronrodriguez J, Fowler E, Siu A, Reuben DB. Screening for balance and mobility impairment in elderly individuals living in residential care facilities. Phys Ther 1995;75:462-9.
22. Fernandes MI. Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para a osteoartrose WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) para a língua portuguesa [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.
23. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. J Rheumatol 1988;15:1833-40.
24. Miyamoto ST, Lombardi Junior I, Berg KO, Ramos LR, Natour J. Brazilian version of the Berg Balance Scale. Braz J Med Biol Res 2004;37:1411-21.
25. Berg KO, Maki BE, Williams JI, Holliday PJ, Wood-Dauphinee SL. Clinical and laboratory measures of postural balance in an elderly population. Arch Phys Med Rehabil 1992;73:1073-80.
26. Abreu SSE, Caldas CP. Gait speed, balance and age: a correlational study among elderly women with and without participation in a therapeutic exercise program. Rev Bras Fisioter 2008;12:324-30.
27. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:111-7.
28. Steffen TM, Hacker TA, Mollinger L. Age- and gender-related test performance in community-dwelling elderly people: Six-Minute Walk Test, Berg Balance Scale, Timed Up & Go Test, and gait speeds. Phys Ther 2002;82:128-37.
29. Cohen J. A power primer. Psychol Bull 1992;112:155-9.
30. Cohen J. The earth is round ($p < .05$). Am Psychol 1994;49:997-1003.
31. Portney LG, Watkins MP. Foundations of clinical research: applications to practice. 3rd ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2008.
32. Montero-Odasso M, Schapira M, Soriano ER, et al. Gait velocity as a single predictor of adverse events in healthy seniors aged 75 years and older. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2005;60:1304-9.
33. Avdic D, Pecar D. Significance of specificity of Tinetti B-POMA test and fall risk factor in third age of life. Bosn J Basic Med Sci 2006;6:50-7.
34. Madureira MM, Takayama L, Gallinaro AL, Caparbo VF, Costa RA, Pereira RM. Balance training program is highly effective in improving functional status and reducing the risk of falls in elderly women with osteoporosis: a randomized controlled trial. Osteoporos Int 2007;18:419-25.
35. Mbourou GA, Lajoie Y, Teasdale N. Step length variability at gait initiation in elderly fallers and non-fallers, and young adults. Gerontology 2003;49:21-6.
36. Bautmans I, Van Hees E, Lemper JC, Mets T. The feasibility of Whole Body Vibration in institutionalised elderly persons and its influence on muscle performance, balance and mobility: a ran-

domised controlled trial [ISRCTN62535013]. BMC Geriatr 2005;5:17.
37. van Baar ME, Dekker J, Oostendorp RA, Bijl D, Voorn TB, Bijlsma JW. Effectiveness of exercise in patients with osteoarthritis of hip or knee: nine months' follow up. Ann Rheum Dis 2001;60:1123-30.
38. Murphy SL, Strasburg DM, Lyden AK, et al. Effects of activity strategy training on pain and physical activity in older adults with knee or hip osteoarthritis: a pilot study. Arthritis Rheum 2008;59:1480-7.
39. Liu CJ, Latham NK. Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults. Cochrane Database Syst Rev 2009;(3):CD002759.
40. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. J Exp Med 1992;175:323-9.
41. Goekoop RJ, Kloppenburg M, Kroon HM, et al. Low innate production of interleukin-1beta and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age. Osteoarthritis Cartilage 2010;18:942-7.
42. Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. Clin Orthop Relat Res 2004;(427 Suppl):S27-36.
43. Waetzig GH, Rosenstiel P, Arlt A, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. FASEB J 2005;19:91-3.
44. Gokhale R, Chandrashekara S, Vasanthakumar KC. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes—an adaptive response. Cytokine 2007;40:123-7.
45. Kaneyama K, Segami N, Yoshimura H, Honjo M, Demura N. Increased levels of soluble cytokine receptors in the synovial fluid of temporomandibular joint disorders in relation to joint effusion on magnetic resonance images. J Oral Maxillofac Surg 2010;68:1088-93.
46. Cope AP, Aderka D, Doherty M, et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. Arthritis Rheum 1992;35:1160-9.

## Suppliers

a. FitVibe; GymnaUniphy NV, Pasweg 6a, 3740 Bilzen, Belgium.
b. Mega Accelerometer, ZPP1-3D-BC The Acceleration Measuring Kit; Mega Electronics Ltd, PO Box 1199 (Microkatu 1) FI-70211, Kuopio, Finland.
c. Stone Fitness Equipment, PO Box 494, Huntertown, IN 46748-0494.
d. Polar F4 Heart Rate Monitor Watch; Polar Electro Oy, Professorintie 5, FIN-90440 Kempele, Finland.
e. ELISA Kit; R&D Systems, Inc, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413.
f. Prism 4.0; GraphPad Software, Inc, 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037.

**7.3 Artigo 2:**

Artigo submetido Journal of Aging and Physical Activity

Fator de impacto: 2.09

Qualis Ciências Biológicas II: B2

Journal of Aging and Physical Activity

# Muscle performance, BDNF, hormonal response and whole body vibration training in elderly woman with knee osteoarthritis

| | |
|---|---|
| Journal: | *Journal of Aging and Physical Activity* |
| Manuscript ID: | Draft |
| Manuscript Type: | Original research |
| Focus Area: | arthritis < clinical populations, assessment < clinical populations, rehabilitation < clinical populations, exercise physiology |
| Statistical Methods: | unpaired < t-Tests, correlation |
| Free-Form Keywords: | Testosterone, Cortisol, Muscle strength, Squat, Brain derived neurotrophic factor |

SCHOLARONE™
Manuscripts

# Muscle performance, BDNF, hormonal response and whole body vibration training in elderly woman with knee osteoarthritis

For Peer Review

**ABSTRACT**

Whole Body Vibration (WBV) has been proposed as an alternative exercise to produce adaptative responses similar to resistance exercise, but with a lower load on the affected joint. The elderly women (mean age 70, SD 5.5) diagnosed with osteoarthritis, were randomized into two groups: (VG, n = 7) performed the squat exercise in combination with WBV, (EG, n = 8) performed the squat without WBV for 12 weeks, 3x/week. The salivary hormone concentrations and plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels were analyzed by ELISA and the load cell was used for assessing isometric quadriceps muscle strength (IQMS). VG demonstrated an increase in IQMS ($p = 0.02$) and in BDNF ($p = 0.03$). There was no change in salivary hormone concentrations between groups. The addition of WBV to squat exercise training improves lower limb muscle performance in elderly women with knee OA.

***Keywords:*** Testosterone, Cortisol, Muscle strength, Squat, Brain derived neurotrophic factor.

For Peer Review

Osteoarthritis (OA) is a chronic, progressive, degenerative disease of multifactorial etiology involving biomechanical, biochemical and genetic factors that contribute to the imbalance between the synthesis and destruction of articular cartilage (Goldring & Goldring, 2004). OA is characterized by arthralgia, stiffness, swelling and decreased muscle strength and functionality (Michael, Schlüter-Brust, & Eysel, 2010). Knee OA is the most common form of OA, affecting approximately 7% of people aged 65-70 years and 11.2% of those aged over 80 years (Michael et al., 2010). According to a meta-analysis conducted by Srikanth et al., (2005) the prevalence and incidence of OA differ by gender with females showing a significantly greater prevalence and severity of knee OA.

The pain and the increase in intra-articular fluid, which are common in knee OA, sensitize the capsular mechanoreceptors that send signals to medullary inhibitory interneurons. These interneurons inhibit alpha motor neurons and, consequently, the signals that would be transmitted to the muscle groups, especially the quadriceps. This phenomenon, called arthrogenic muscle inhibition, is likely generated by the abnormal afferent information of the affected joint resulting in the decreased activation of the muscles that act there (McNair, Marshal, & Maguire, 1996), progressing to a loss of muscle mass and influencing the performance of daily living activities such as walking, climbing stairs and rising from a chair (Sharma et al., 2003). Furthermore, age-related muscle loss is also a result of reductions in the size and number of muscle fibers, possibly due to a multifactorial process that involves physical inactivity, nutritional intake, oxidative stress, and hormonal changes

For Peer Review

corresponding to a condition known as sarcopenia. In addition, marked motoneuron loss and aberrant neuromuscular sprouting have been observed in aged mammals (Baumgartner, Waters, Gallagher, Morely, & Garry, 1999).

The reversal of this situation can be achieved with physical exercise that induces a cascade of molecular and cellular processes that support neuronal plasticity and/or hormonal change. Recently, whole body vibration (WBV) training has been recommended as an effective alternative for strength training in elderly people (Lau et al., 2011; Rees, Murphy, & Watsford, 2008), and various physiological effects are obtained in response to acute exercise performed on a vibratory platform, such as an increase in muscle activation (Abercromby et al., 2007) improved muscle performance (Lau et al., 2011; Roelants, Delecluse, Goris, & Verschuren, 2004), and alterations in hormonal levels (Erskine, Smillie, Leiper, Ball, & Cardinale, 2007; Roschel et al., 2011).

During this training modality, the individual stands on a platform that generates vertical sinusoidal vibrations. These mechanical stimuli are transmitted to the body where they stimulate the primary endings of the muscle spindles, which in turn activate α-motor neurons, resulting in muscle contractions known as tonic vibration reflex (Cardinale & Bosco, 2003). The WBV training is a safe, suitable and effective training method that produce effects similar to regular strength training, but with a lower load on the affected joint. Therefore, it is a potentially feasible intervention for those patients that cannot participate in conventional strength training, such as patients with knee OA (Lau et al., 2011; Trans et al., 2009).

For Peer Review

Our group recently demonstrated improvements in the functionality of the affected joint and the self-perception of the disease status, including knee pain, stiffness and functionality, and a decrease of inflammatory markers in elderly subjects with knee OA after a 12-week training program, in which WBV was added to squat exercise training (Avelar et al., 2011; Simão et al., 2012). However, to the best of our knowledge, only one study has evaluated the effect of WBV training on muscle strength in elderly people with knee OA. In that study, it was reported that a WBV-exercise regime on a platform increased muscle strength compared to the control group in women with knee OA (Trans et al., 2009). Nevertheless, there is a gap in the literature regarding the possible mechanism related to the improvement of muscle performance in this population.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the neurotrophic factor family that plays key roles in regulating survival, growth and maintenance of neurons (Lindsay, 1994) in differentiation, synaptic plasticity and synaptic transmission efficacy (Knaepen, Goekint, Heyman, & Meeusen, 2010), and it is involved in muscle regeneration (Sakuma & Yamaguchi, 2011). Of the neurotrophins, BDNF, which is considered a contraction-inducible protein in skeletal muscle (Mathews et al., 2009), appears to be the most susceptible to regulation by exercise and physical activity (Coelho et al., 2012; Knaepen et al., 2010). Considering also that during vibratory exercise, the mechanical stimuli are transmitted to the body where they stimulate the primary endings of the muscle spindles, which in turn activate α-motor neurons, resulting in muscle contractions (Trans et al., 2009), it is

For Peer Review

possible that this type of training might induce changes in the plasma levels of BDNF, preventing the degeneration of motoneurons and muscle fiber innervations in the elderly with knee OA.

Reports in the literature indicate that the observed reduction in muscle strength occurs in conjunction with alterations in the hormonal profile of older individuals (Enea, Boisseau, Fargeas-Gluck, Diaz, & Dugué, 2011). The evaluation of the endocrine system plays an important role in determining the individual response to exercise, and changes in the concentration of testosterone and cortisol have received significant attention due to their striking effects on bone remodeling and muscle strength (Cardinale, Soiza, Leiper, Gibson, & Primrose, 2010; Enea et al., 2011). Testosterone and cortisol secretion appear to be acutely affected by strength training sessions in young men, but there is no consensus on the responses of elderly women (Erskine et al., 2007). Moreover, for chronic exercise or training, the available data in the literature are inconclusive, and there are circumstances where exercise leads to a decrease in circulating androgens. Therefore, it was suggested that hormonal changes may have a significant impact on female physiology and physical performance (Crowley & Matt, 1996; Uchida et al., 2004).

Furthermore, testosterone (T) and cortisol (C) have been analyzed to calculate the T/C ratio, which is an index of the anabolic and catabolic balance used to predict performance (Uchida et al., 2004). The ratio between the concentration of testosterone and cortisol is frequently used as an indicator of the stress level that is imposed by the exercise. Alterations in the concentration of these hormones are

For Peer Review

responsible for modulating several responses induced by training, such as hypertrophy and strength gain (Crowley & Matt, 1996; Uchida et al., 2004).

Because knee OA in older adults contributes to a greater deterioration in muscle strength (Srikanth et al., 2005) and the reduction in muscle strength could be the result of changes in neuromuscular activation (McNair et al., 1996) and/or in the hormonal profiles of the elderly (Cardinale et al., 2010), it is believed that the addition of WBV to squat exercise training could promote an increase in muscle strength (Trans et al., 2009) resulting from changes in neuromuscular activation and/or the testosterone/cortisol ratio in older women with OA (Cardinale et al., 2010). Therefore, the present study was designed to investigate the effects of WBV in addition to squat exercise training in elderly women with knee OA on the following parameters: 1) isometric strength of the quadriceps muscle; 2) BDNF plasma concentration; and 3) the testosterone/cortisol salivary concentration ratio. Our hypothesis was that the addition of WBV to squat exercise training would increase the isometric strength of the quadriceps muscle and the BDNF plasma concentrations (neuronal plasticity) and/or the testosterone/cortisol ratio (hypertrophy) in older women with knee OA.

## Methods

### Study Design and Participants

This is a randomized, controlled trial in which the variables were assessed 24 h before and 24 h after a 12-week training program. For the allocation of participants,

For Peer Review

a 1:1 ratio randomization was performed using opaque envelopes for allocation concealment. To minimize the chance of bias, we used the following methods: a) opaque, sealed and serial-numbered envelopes; b) the envelopes were opened sequentially after the participant name and details were written on the envelope; and c) the envelopes were kept in a locked and secure place. The allocation sequence was concealed from the researcher enrolling and assessing participants. Only one researcher performing the randomization was aware of the group assignment. The study was approved by the Internal Review Board of the University Federal of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (#001/08).

The volunteers were recruited through the Physiotherapy Clinic of the Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys and through medical referrals. To participate in the study, volunteers were required to meet the following inclusion criteria: females older than 60 years of age; not using hormone replacement therapy; and diagnosed with OA in at least one knee in accordance with of the American College of Rheumatology (Hinton, Mood, Davis, & Thomas, 2002). The severity of the knee OA was classified radiographically according to the Kellgren and Lawrence scale [grades 0-4, with 0 being normal and 4 representing severe OA]. A Grade 2 classification [definite osteophytes and possible narrowing of joint space] was used as a cutoff to determine knee OA (Kellgren & Lawrence, 1957). Further inclusion criteria included the following: no recent knee injury; no walking aid requirement; and no rehabilitation procedures in the previous three months. Volunteers were excluded if they had any orthopedic, neurological, respiratory or acute cardiac

For Peer Review

cognitive deficit as determined by the Mini-Mental State Examination (Brucki, Nitrini, Caramelli, Bertolucci, & Okamoto, 2003).

Of the 125 elderly people screened for eligibility, 15 elderly women fulfilled the criteria, had saliva and blood sampling collected at rest (8:00 a.m.) and then participated in the IQMS test. Thereafter, the subjects were allocated to one of two groups: 1) the vibration group, in which participants performed squat exercise training in association with WBV (VG; n=7); or 2) the exercise group, in which participants performed squat exercise training without vibration (EG; n=8; **Fig 1**).

**Procedures**

The clinical and demographic data were collected from the participants using an evaluation chart. Prior to the initiation of the 12-week intervention program, a saliva sample was collected at 8:00 a.m. from the volunteers of all groups followed by the isometric quadriceps muscle strength (IQMS) evaluation. At 24 h after the intervention period, the volunteers of both groups were reassessed. These procedures were performed to avoid any circadian rhythm effects on hormonal status and the performance of IQMS. The tests were performed by an experienced examiner who was blind to the group allocation.

The intervention program consisted of performing squat exercise training with (VG) or without (EG) whole body vibration, three times a week on alternate days.

*Warm-up:*

For Peer Review

Prior to each training session, the participants warmed-up on an stationary cycle (Stone Fitness, Huntertown, United States of America) at 70% of the predicted maximum heart rate for each subject's age and were monitored using a Polar heart rate monitor (Polar F4, Kempele, Finland) for 10 minutes. Immediately afterwards, the participants of the VG group were placed in a position with their feet 28 cm apart (14 cm to the right and 14 cm to the left of the center of the vibration stimulus) and were ready to begin the squat exercises on the vibratory platform, while the participants of the EG group performed the same procedure without vibration.

*Squat exercises:*

The intensity of squat exercise training was systematically augmented in the vibration and exercise groups over the training period by increasing the number of repetitions (6 x 20 seconds to 8 x 40 seconds) and reducing the resting time (40 to 25 seconds). These parameters were based on the study by Avelar et al. (15). During each exercise repetition, the examiner instructed the volunteer to perform 3 seconds of isometric contraction of the quadriceps at a knee angle of 60° flexion and 3 seconds of isometric contraction of the quadriceps at a knee angle of 10° flexion. The 60° angle was measured in each volunteer using a universal goniometer prior to initiating the exercise series, and a barrier was placed at the gluteal region to limit the degree of flexion of the knee. The participants of both groups were placed in position with their feet 28 cm apart.

For Peer Review

*Whole body vibration:*

For the volunteers in the VG group, a commercial model of *a vertical sinusoidal* vibration platform was used (FitVibe, GymnaUniphy NV, Bilzen Belgium). For this group, the parameters of the vibration were based on the principles of training load progression: the frequency varied from 35 to 40 Hz, the peak-to-peak displacement was 4 mm and the acceleration ranged from 2.78 to 3.26 g. [For more details, see Avelar et. al., 2011] The choice of the vibratory frequencies and the amplitude were set to obtain an acceleration range between 2 and 5 g, which was suggested to be sufficient for achieving physiological effects according to Delecluse, Roelants, and Verschueren (2003).

Prior to initiating data collection, the platform acceleration values were verified using the Mega accelerometer (ZPP1-3D-147BC; The Acceleration Measuring Kit). The protocol was designed in accordance with the ISO 2631-1 guidelines for the prescription of training intensity, in which the ideal parameters of frequency, amplitude and time of exposure to whole-body vibration are defined based on the acceleration values (Griffin, 2004) and recommendations of the International Society of Musculoskeletal and Neuronal Interactions (Rauch et al., 2010).

**Main Outcomes Measurements:**

***Isometric quadriceps muscle strength (IQMS):*** The IQMS was evaluated by the maximal voluntary isometric contraction of knee extensors (MVIC) measured using the load cell according to Neves, Tossige-Gomes, Avelar, Simão, and Lacerda (2011). For this evaluation, the volunteer was positioned in flexion-extension chair

For Peer Review

model) and assumed a sitting posture with a straight trunk and the hips flexed at 90º. The limb to be tested was positioned at 60° of knee flexion (assessed individually by goniometry of the knee), and the resistance lever was positioned on the distal leg.

The load cell was properly calibrated and positioned near the leg extension perpendicular to the ground for signal acquisition during the isometric muscle strength tests (Miotec - Biomedical Equipment). The load cell was connected to the software MIOTOOL 400 that transmitted the isometric muscle strength values to a computer. The MVIC test was performed for 6 seconds with 1 minute between sets and with repeating three sets per leg.

Before the test, the volunteers warmed up for 10 minutes on a stationary bicycle (Stone Fitness, 2001), which stimulated the heart rate (HR) to 70% of the estimated maximum HR by age, as measured with the use of the Polar heart monitors (model F4). This procedure was performed to reduce the risk of injury during testing (Brow & Weir, 2003).

The intra-class correlation coefficient (ICC) for IQMS was 0.98 (95% CI: 0.94-0.99).

***Analysis of BDNF by ELISA:*** For plasma processing, 10-mL peripheral blood samples were collected from the antecubital vein using aseptic techniques and heparin as an anticoagulant. The blood was immediately centrifuged twice at 3,000 g for 10 min, and the plasma was kept frozen at -70º C until assayed. Plasma BDNF levels were measured using ELISA kits for BDNF (BDNF DuoSet, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions; the detection limit was 10 pg/mL.

For Peer Review

***Saliva sampling and analysis of hormone levels:*** To measure salivary hormone concentrations and determine the testosterone/cortisol concentration ratio, the participants were instructed to avoid any food intake, the drinking of hot fluids, or brushing their teeth for 2 h before the assessment. The participants were instructed to maintain their normal dietary intake on each testing day (Rommerts, 1998). The subjects were asked to remain seated in the laboratory area for 20 min before the saliva collection.

The patient saliva was collected using Salivette® (Sarstedt, Numbrecht, Germany). The samples were promptly stored in a home freezer or refrigerated box before storage in the laboratory, where they were kept at -20° C. The samples were thawed and centrifuged at least once to allow for the precipitation of mucins before the analysis of salivary cortisol and testosterone concentrations using enzyme immunoassay kits (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, USA and Salimetrics LLC, State College, USA). The analytical sensitivities were 0.011 µg/dL and 1.0 pg/mL, respectively, and the coefficients of variation (inter- and intra-assay) were <10%.

The hormone levels in saliva were evaluated because the concentration of hormones in saliva is proportional to the levels in plasma. In addition, any afferent signal stressor such as blood withdrawal can modify the levels of hormone secretion. Moreover, the free form of the hormone is the active form. Only the free, unbound form of steroids can enter saliva, and the concentration of free testosterone in saliva is proportional to that in blood (Rommerts, 1998).

For Peer Review

**Data Analysis**

The SPSS statistical software program (IBM, Chicago, IL, USA) version 18.0 was used for the statistical analyses. P-values $\leq$ 0.05 were considered to be statistically significant. We performed the analysis between groups by variation (Δ) within each group, where Post value – pre value = Delta value (Δ). The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normality of the data [Delta value (Δ)]. Because the data were normally distributed for the dependent variables, parametric tests were used for the statistical analyses. The deltas values for VG group and EG group were compared using independent t-tests and correlation among the variables were analyzed using the test of Pearson's correlation. To check the size of the differences between the pre- and post-training periods and between groups, we calculated the effect size (Cohen, 1992). A magnitude of effect analysis is an additional measure to the traditional statistical test of the null hypothesis and aims to verify the clinical significance of the effect found and is not limited to dichotomous [significant or not significant] results (Ferreira, Lima, Peixoto, & Haase, 2008). Thus, with a magnitude of effect analysis, it is possible to identify whether the observed differences are small, moderate or large.

In the present study, despite a moderate effect size found on the testosterone, strength and BDNF before the intervention, we cannot discard the occurrence of type II error, since that the power presented was approximately 61% (Portney & Watkins, 2009). Therefore, to avoid that possible differences found before training would influence the final results, all analyzes were performed considering the variations

For Peer Review

occurred before and after the intervention period (delta) with comparisons between-group being made based on these differences. It is worth mentioning that the statistical power of the analysis considering the delta was high for muscular strength (power > 0.74), plasma concentrations of BDNF (power > 0.74) and salivary testosterone concentrations (power > 0.85). However, for the variable cortisol, we found a low power statistical, indicating that a larger sample would ensure better our results.

***Sample Size:*** As testosterone is the major circulating androgen in the human male (Erskine et al., 2007) and contributes to the processes of muscular hypertrophy and bone growth, it is related to an increase in muscle strength. Therefore, testosterone was selected as the major outcome variable of the present study. Because of this, the sample size calculation was conducted considering this variable.

Only one study has been conducted to check the hormonal responses to a single session of whole body vibration exercise in the elderly, and the cited study was used as a reference to calculate the sample size due to some similarities between the dependent variables and the sample characteristics (Uchida et al., 2004). Therefore, as the difference between groups detected in the study of Cardinale et al. (2010) was higher than 150 pmol/L and the standard deviation was 100 pmol*$L^{-1}$, we defined the minimum significant difference to be detected between groups as 150 pmol/L. Considering this, we defined that the minimum significant difference to be detected between groups should be 150pmol/L, a significance level of 95% and a statistical

For Peer Review

power of 80%. As a result, was calculated that at least 7 participants would be required in each group.

The formula used to calculate the sample size was [comparison of quantitative measures between different groups] (Jekel, Katz, Wild, & Elmore, 2001):

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \text{ x } 2 \text{ x } dp^2}{d^2}$$

Where:

n: sample size;

$Z_\alpha$ and $Z_\beta$: values of the cumulative distribution function of a standard normal distribution, associated with the probability of type I errors (α) and type II errors (β) in bilateral tests of the hypotheses;

dp: the standard deviation of the major outcome variable of the study, obtained from the literature; and

d: the minimum difference to be detected in the major outcome variable between groups, defined by the researcher or obtained from the literature.

## Results

All participants in both intervention groups complied with the full intervention program. Overall compliance was 99.7% in the VG group and 98.6% in the EG group. There was no significant difference between the groups with respect to compliance ($p = 0.41$). No adverse effects were reported by the subjects.

For Peer Review

There were no significant differences between the groups with respect to mean age (71 ± 7.17 VG vs 70 ± 4.07 EG), body mass (72.57 ± 12.77 VG vs 75.45 ± 10.53 EG), height (1.55 ± 0.05 VG vs 1.57 ± 0.09 EG) or severity of knee OA [Classified radiographically according to Kellgren and Lawrence scale – VG: degree 2 (50%), 3 (10%), 4(40%) and EG: degree 2 (20%), 3 (30%), 4 (50%)] (Table 1).

No significant differences were found in the data collected prior to training between the groups. Although not statistically significant, the difference between-group of muscle strength, BDNF, and testosterone at baseline is quite substantial, with a Cohen's d value of -0.97, -0.87, and 1.04, respectively (Table 2).

To control the possible differences between groups in the baseline, the IQMS, BDNF plasma and testosterone/cortisol plasma concentration ratio were performed considering the deltas (post training minus pre training results) for each group, as indicated by Δ.

The IQMS data, showed a significant increase in the VG group compared with the EG group (IQMS; $p = 0.02$; effect size = 1.33; **Fig 2A**) (Table 2). After the intervention period, compared to the start of the study, the IQMS increased on average 2.17 Kgf in the VG group and decreased on average 1.66 Kgf in the EG group (**Fig 2A**).

The BDNF plasma concentration variation (Δ) demonstrated a significant increase in the VG group compared with the EG group (Table 2) (BDNF; $p = 0.03$; effect size = 1.23; **Fig 2B**).

For Peer Review

The highest correlation was found between the IQMS and BDNF (Pearson's r = 0.71 and $p < 0.003$; **Fig 3**)

In respect to hormone levels, there was no difference between the groups in the testosterone/cortisol plasma concentration ratio (Δ) (T/C ratio; $p = 0.61$; effect size = -0.79; **Fig 4**) (Table 2).

## Discussion

To our knowledge, this was the first randomized study designed to determine whether the addition of WBV to squat training could improve IQMS and affect the BDNF plasma concentration and testosterone/cortisol salivary hormonal ratio in elderly women with knee OA. The results of this study indicated that the addition of WBV to squat exercise training improved IQMS values and increased plasma BDNF concentrations without a change in the testosterone/cortisol salivary hormonal ratio in the studied population.

The increase in IQMS observed when adding WBV to squat exercise training in elderly people is consistent with reports in the literature (Lau et al., 2011; Ress et al., 2008). The chronic effect of WBV training in IQMS is in accordance with the hypothesis that the tonic vibration reflex primarily affects the subject's ability to generate high firing rates in high-threshold motor units (Roelants et al., 2004). In addition, it is suggested that the recruitment thresholds of the motor units during WBV is lower than with voluntary contractions, probably resulting in a more rapid activation and training of high-threshold motor units. (Roelants et al., 2004)

For Peer Review

However, it is important to mention that the studies cited above (Lau et al., 2011; Rees et al., 2008; Roelants et al., 2004) were performed by elderly subjects with no history of knee OA. Knee OA appears to lead to a significant reduction in quadriceps muscle strength and, consequently, the ability to walk, climb stairs and rise from a chair, especially in elderly people. Therefore, it is imperative to study the effect of the addition of WBV to squat exercise training in elderly people with knee OA.

To our knowledge, there is only one study in the literature that investigated and demonstrated the effectiveness of WBV training on quadriceps muscle strength in individuals with knee OA compared to a control group [without intervention] (Trans et al., 2009). Although our results corroborate this study, some differences should be mentioned between the two studies. In the study of Trans et al. (2009), the intervention group was subjected to only whole-vibration training, and the control group did not participate in any type of intervention. However, in the present study, the effects of adding whole-body vibration to squat training was evaluated. Moreover, in our study, there was standardization of the knee flexion angle, and in the study of Trans et al. (2009) the participants flexed their knees until the position was self-perceived.

Is it important to mention that the increase in knee extensor muscle strength observed in our study for the VG group has a strong clinical impact, as the literature indicates that the minimum detectable change in isometric quadriceps muscle strength is 2.25 Nm (Kean, Birmingham, Garland, Bryant, & Giffin, 2010). Considering that 1

For Peer Review

kgf corresponds to 9.81 Nm, the observed increase of 2.17 kgf in IQMS in the VG group corresponds to 21.29 Nm (a value close to the minimum recommended).

There are two possible explanations for the result that the addition of WBV to squat exercise training improves lower limb strength in elderly women with knee OA. First, WBV training could have produced a neuromuscular adaptation such as an increased number of motor units and improvement in the synchronization of these motor units. Second, it could have produced an increase in muscle mass resulting from changes in the balance of anabolic (testosterone) and catabolic (cortisol) hormones.

We proposed in the present study to investigate the effect of adding WBV to squat exercise training on BDNF plasma concentrations. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been proposed as an essential neurotrophin related to neuronal plasticity (Knaepen et al., 2010) that plays an important role in old-age survival because of its role in preventing neuronal death during stress (Chevrel, Hohlfeld, & Sendtner, 2006). In addition, the expression profiling of BDNF has shown that this neurotrophin is expressed differentially in skeletal muscles under various physiological and pathological conditions (Chevrel et al., 2006). Several studies have demonstrated that BDNF is a protein that is produced in skeletal muscle cells, and its expression is increased by contraction to enhance fat oxidation in an AMPK-dependent fashion, most likely by acting in an autocrine and/or paracrine manner within skeletal muscles (Cardinale et al., 2010; Uchida et al., 2004).

For Peer Review

As a result, a significant increase in the VG group compared with the EG group was observed in BDNF levels. However, this difference cannot be attributed only to the increase in BNDF levels in VG, once the EG group showed a decrease in the concentration of BDNF after training. The recent study of Coelho et al. (2012) assessed the impact of a physical therapy intervention (PTI) on BDNF levels in elderly women who were classified as non-frail (= 569.5 ± 336.6 pg/mL) or pre-frail (396.4 ± 215.1 pg/mL). In that study, the training group performed a 10-week progressive dynamic resistance-training program of knee extensors and flexors three times per week. As a result, both groups had an increase in BDNF levels after the PTI. It seems that exercise and/or training temporarily elevates basal BDNF and possibly upregulates the cellular processing of BDNF [i.e., synthesis, release, absorption and degradation] (Coelho et al., 2012). Increasing evidence suggests that this family of neurotrophic factors influences not only the survival and function of innervating motoneurons but also the development and differentiation of myoblasts and muscle fibers (Knaepen et al., 2010). Considering that: 1). before training, the population of the present study had a high BDNF level (VG = 3630 ± 948.1 pg/mL and EG = 3013 ± 632.9 pg/mL) compared to Coelho's study (2012); 2). thereafter 12 weeks of training the VG group presented a higher increase in BDNF levels and IQMS compared to EG group.; it could be hypothesized that the squat associated WBV could increase even more the BDNF level as well as could improve the isometric muscular strength of the quadriceps compared with EG group.

For Peer Review

The increase in IQMS and BDNF levels in VG group associated with a strong correlation between these variables (Spearman $r = 0.71$ and $p < 0.003$) leads us to believe that possibly the improvement of isometric force is related to BDNF levels in the studied population. This supposition strengthens the hypothesis of that WBV training improves isometric muscle strength of quadriceps due to the neuromuscular adaptation.

Despite reports in the literature indicate that the observed changes in muscle strength occur in conjunction with alterations in the hormonal profile of aging humans (Cardinale et al., 2010). Therefore, it was suggested that hormonal changes have a significant impact on female physiology and physical performance (Uchida et al., 2004). For chronic exercise or training, the available data in the literature regarding the effect of exercise training on hormonal concentrations are inconclusive, and there are circumstances in which exercise training leads to a decrease in circulating androgens (Enea et al., 2011). In this study, the addition of WBV to squat exercise training preserved the testosterone/cortisol ratio variation (Δ), demonstrating that the augmentation of muscle strength in the studied population was not a result of changes in the ration anabolism (testosterone) and catabolism (cortisol) hormonal.

## Limitation

This study has some limitations. First, the BDNF level was measured in the circulation (blood) and not in the synovial fluid. A further minor limitation is that the study was undertaken using data only from female subjects. OA is increasingly

For Peer Review

recognized to be site- and sex-specific, and therefore, the present results may not be directly extrapolated to men.

## Conclusions

In conclusion, this is the first study that indicates that the addition of whole body vibration to squat exercise training may improve lower limb muscle performance in elderly women with knee OA. Additionally, the data also suggest that there was an adaptive response in BDNF without a change in muscular anabolism/catabolism relationship.

## References

Abercromby, A. F. J., Amonette, W. E., Layne, C.S., McFarlin, B. K., Hinman, M. R., & Paloski, W. H. (2007). Variation in neuromuscular responses during acute whole-body vibration exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 39*, 1642-1650.

xxxxxxxxxx xxxxx Deleted for blind review purposes.

Baumgartner, R. N., Waters, D. L., Gallagher, D., Morley, J. E., & Garry, P. J. (1999). "Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women," *Mechanisms of Ageing and Development*, *107*(2), 123–136.

Brown, L. E., & Weir, J. P. (2003). Procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento, 11*, 95-110.

For Peer Review

Brucki, S. M. D., Nitrini, R., Caramelli, P., Bertolucci, P. H. F., & Okamoto, I. H. (2003). Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arquivos de Neuro-psiquiatria, 61*, 777-781.

Cardinale, M., & Bosco, C. (2003). The use of vibration as an exercise intervention. *Exercise and Sport Sciences Review, 31*, 3-7.

Cardinale, M., Soiza, R. L., Leiper, J. B., Gibson, A., & Primrose, W. R. (2010). Hormonal responses to a single session of wholebody vibration exercise in older individuals. *British Journal of Sports Medicine, 44*, 282-288.

Chevrel, G., Hohlfeld, R., & Sendtner, M. (2006). The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. *Muscle and Nerve, 33*(4), 462–476.

Coelho, F. M., Pereira, D. S., Lustosa, L. P., Silva, J. P., Dias, J. M. D., Dias, R. C. D., et al. (2012). Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *54*(3), 415-420.

Cohen, J. (1992). Quantitative methods in psychology: A power prime. *Psychological Bulletin, 112*, 155-159.

For Peer Review

Crowley, M., & Matt, K. S. (1996). Hormonal regulation of skeletal muscle hypertrophy in rats: the testosterone to cortisol ratio. *European Journal of Applied Physiology, 73*, 66-72.

Delecluse, C., Roelants, M., & Verschueren, S. (2003). Strength increase after whole-body vibration compared with resistance training. *Medicine and Sciences in Sports and Exercise, 35*(6), 1033-41.

Enea, C., Boisseau, N., Fargeas-Gluck, M. A., Diaz, V., & Dugué, B. (2011). Circulating androgens in women: exercise-induced changes. *Sports Medicine, 41*, 1-15.

Erskine, J., Smillie, I., Leiper, J., Ball, D., & Cardinale, M. (2007). Neuromuscular and hormonal responses to a single session of whole body vibration exercise in healthy young men. *Clinical Physiology and Functional Imaging, 27*, 242-248.

Ferreira, F. O., Lima, E. P., Peixoto, M. A. L., & Haase, V. G. (2008). Selecting neuropsychological tests for use in multiple sclerosis and temporal lobe epilepsy: relevance of effect size estimations. *Interamerican Journal of Psychology, 4*, 1-16.

For Peer Review

Goldring, S. R., & Goldring, M. B. (2004). The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research, 427*, 27-36.

Griffin, M. J. (2004). Minimum health and safety requirements for workers exposed to hand-transmitted vibration and whole-body vibration in the European Union; a review. *Occupational and Environmental Medicine,* 61(5), 387-97.

Hinton, R., Mood, R. L., Davis, A. W., & Thomas, S. F. (2002). Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. *American Family Physician, 65*, 841-848.

Jekel, J. F., Katz, D. L., Wild, D., & Elmore, J. G. (2001). *Epidemiology biostatistics and preventive medicine* (2th ed.). Philadelphia: Saunders Press.

Kean, C. O., Birmingham, T. B., Garland, S. J., Bryant, D. M., & Giffin, J. R. (2010). Minimal detectable change in quadriceps strength and voluntary muscle activation in patients with knee osteoarthritis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 91*, 1447-1451.

Kellgren, J. H., & Lawrence, J. S. (1957). Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases, 16*, 494-502.

Knaepen, K., Goekint, M., Heyman, E. M., & Meeusen, R. (2010). Neuroplasticity – Exercise-Induced Response of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor.

For Peer Review

A Systematic Review of Experimental Studies in Human Subjects. *Sports Medicine, 40*(9), 765-801.

Lau, R. W. K., Liao, L. R., Yu, F., Teo, T., Chung, R. C., & Pang, M. Y. C. (2011). The effects of whole body vibration therapy on bone mineral density and leg muscle strength in older adults: a system review and meta-analysis. *Clinical and Rehabilitation*, *25*(11), 975-88.

Lindsay, R. M. (1994). Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiology of Aging, 15*, 249–251.

Matthews, V. B., Aström, M. B., Chan, M. H., Bruce, C. R., Krabbe, K. S., Prelovsek, O., et al. (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia, 52*(7), 1409-1418.

McNair, P. J., Marshall, R. N., & Maguire, K. (1996). Swelling of the knee Joint: Effects of exercise on Quadriceps muscle strenght. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *77*, 896-899.

Michael, J. W-P., Schlüter-Brust, K. U., & Eysel, P. (2010). The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Ärzteblatt international, 107*, 152-62.

For Peer Review

Knaepen, K., Goekint, M., Heyman, E. M., & Meeusen, R. (2010). Neuroplasticity – Exercise-Induced Response of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor. A Systematic Review of Experimental Studies in Human Subjects. *Sports Medicine, 40*(9), 765-801.

Lau, R. W. K., Liao, L. R., Yu, F., Teo, T., Chung, R. C., & Pang, M. Y. C. (2011). The effects of whole body vibration therapy on bone mineral density and leg muscle strength in older adults: a system review and meta-analysis. *Clinical and Rehabilitation*, *25*(11), 975-88.

Lindsay, R. M. (1994). Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiology of Aging, 15*, 249–251.

Matthews, V. B., Aström, M. B., Chan, M. H., Bruce, C. R., Krabbe, K. S., Prelovsek, O., et al. (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia, 52*(7), 1409-1418.

McNair, P. J., Marshall, R. N., & Maguire, K. (1996). Swelling of the knee Joint: Effects of exercise on Quadriceps muscle strenght. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *77*, 896-899.

For Peer Review

Michael, J. W-P., Schlüter-Brust, K. U., & Eysel, P. (2010). The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Ärzteblatt international, 107*, 152-62.

Neves, C. D., Tossige-Gomes, R., Avelar, N. C. P., Simão, A. P., & Lacerda, A. C. (2011) Assessing the reliability of isometric strength of knee extensors by using load cell. *Terapia Manual, 9*, 16-21.

Portney, L. G., & Watkins, M. P. (2009). *Foundations of clinical research: Applications to practice* (3th ed.). Upper Saddle River: Prentice-Hall Press.

Rauch, F., Sievanen, H., Boonen, S., Cardinale, M., Degens, H., Felsenberg, D., et al. (2010). Reporting whole-body vibration intervention studies: Recommendations of the International Society of Musculoskeletal and Neuronal Interactions. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 10*(3), 193-198.

Rees, S. S., Murphy, A. J., & Watsford, M. L. (2008). Effects of whole body vibration exercise on lower-extremity muscle strength and power in an older population: a randomized clinical trial. *Physical Therapy, 88*, 462-70.

Roelants, M., Delecluse, C., Goris, M., & Verschuren, S. (2004). Whole body vibration training increases knee-extension strength and speed of movement in older women. *Journal of the American Geriatric Society, 52*, 901-908.

For Peer Review

Rommerts, F. F. G. (1998). Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and nongenomic actions. In: Nieschlag, E., & Behre, H. M. (Editors), *Testosterone Action-Deficiency-Substitution* (pp. 1-31). London: CRC Press.

Roschel, H., Barroso, R., Batista, M., Ugrinowitsch, C., Tricoli, V., & Arsati, F. (2011). Do whole-body vibration exercise and resistance exercise modify concentrations of salivary cortisol and immunoglobulin A? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 44*, 592-597.

Sakuma, K., Yamaguchi, A. (2011). Review Article: The Recent Understanding of the Neurotrophin's Role in SkeletalMuscle Adaptation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology, 25*, 1-12.

Sharma, L., Cahue, S., Song, J., Hayes, K., Pai, Y. C., & Dunlop, D. (2003). Physical Functioning Over Three Years in Knee Osteoarthritis: Role of Psychosocial, Local Mechanical, and Neuromuscular Factors. *Arthritis & Rheumatism, 48*(12), 3359–3370.

Simão, A. P., Avelar, N. C. P., Tossige-Gomes, R., Neves, C. D., Mendonça, V. A., Miranda, A. S., et al. (2012). Functional performance and inflammatory cytokines after training with squat exercises association with whole-body vibration in elderly with knee osteoarthritis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 93*, 1692-1700.

For Peer Review

Srikanth, V.K., Fryer, J.L., Zhal, G., Winzenberg, T.M., Hosmer, D., & Jones, G. (2005). A metaanalysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *13*, 769-781.

Trans, T., Aaboe, J., Henriksen, M., Christensen, R., Bliddal, H., & Lund, H. (2009) Effect of whole body vibration exercise on muscle strength and proprioception in females with knee osteoarthritis. *Knee, 16*, 256-261.

Uchida, M. C., Bacurau, R. F. P., Navarro, F., Pontes, F. L. Jr., Tessuti, V. D., Moreau, R. L., et al. (2004). Alteration of testosterone:cortisol ratio induced by resistance training in women. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 10*(3), 169-172.

For Peer Review

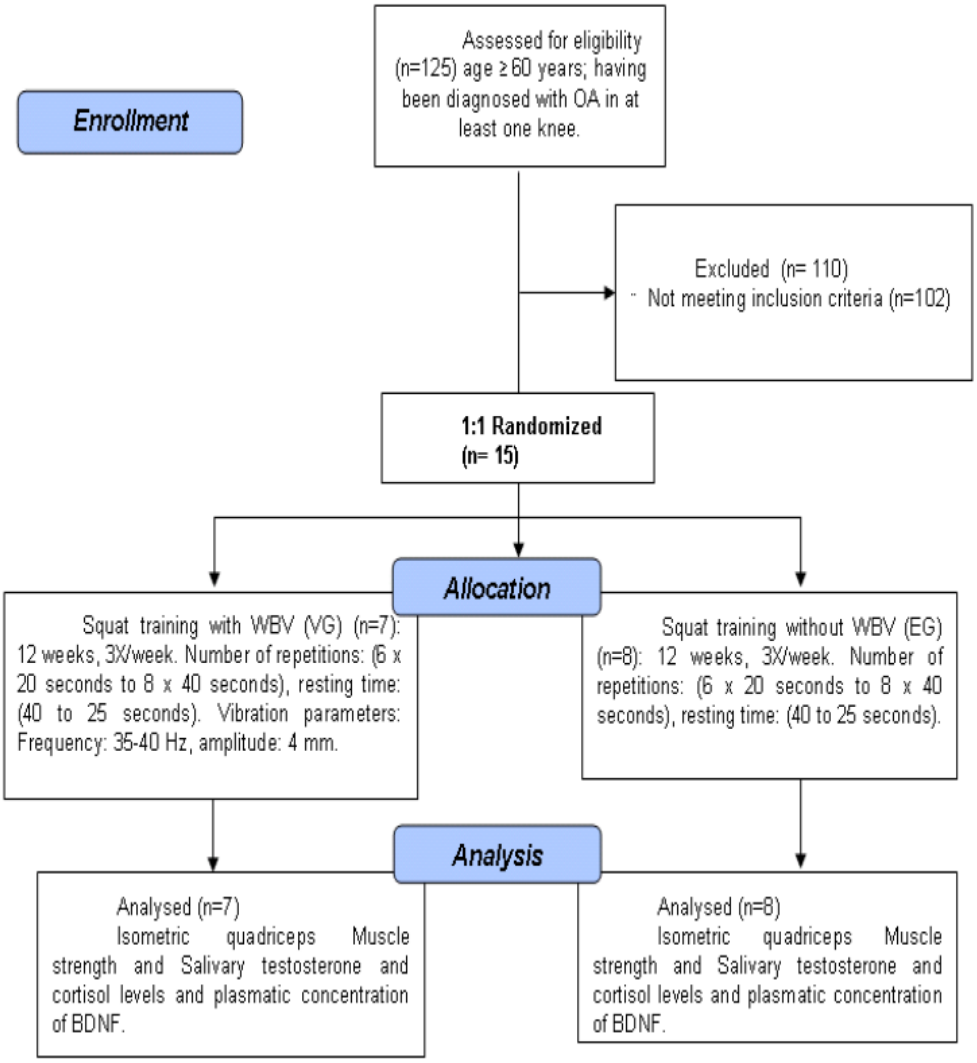



Figure 1 The study flow chart. Test #1 refers to the evaluation performed immediately prior to the training, and test #2 refers to the final evaluation. VG (vibration group), EG (exercise group).

**Table 1 Sample characterization of the vibration group (VG) and exercise group (EG). Data presented as means (SD).**

*** p-value ≤ 0.05.**

| Characteristics | VG (N: 7) | | | EG (N: 8) | | | Effect size | t value (95%CI) | p-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Age (years) | 71 (7) | | | 70 (4) | | | 0.18 | 0.75 (-4.16 – 8.62) | 0.46 |
| Body mass (kg) | 72.57 (12.77) | | | 75.45 (10.53) | | | -0.25 | 0.48 (-36.15 – 13.25) | 0.64 |
| Height (meters) | 1.55 (0.05) | | | 1.57 (0.09) | | | -0.27 | 0.60 (-0.11 – 0.06) | 0.56 |
| Severity of knee OA[#] (%) | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | — | — | — |
| | 50 | 10 | 40 | 20 | 30 | 50 | | | |

*Note.* [#] Classified radiographically according to Kellgren and Lawrence scale.

For Peer Review

**Table 2 Variables (before and after training) of the vibration group (VG) and exercise group (EG). Data presented as means (SD). p-value < 0.05**

| Variables | VG (N: 7) | EG (N: 8) | Effect size | t value (95%CI) | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| **Before Training** | | | | | |
| Muscle Strength (Kgf) | 21.89 (2.57) | 25.25 (4.18) | -0.97 | -1.84 (-7.31 – 0.59) | 0.09 |
| Plasma BDNF concentration (pg/mL) | 3365 (1751) | 4998 (1989) | -0.87 | -1.68 (-3738 – 472) | 0.12 |
| Salivary testosterone (pg/mL) | 144.7 (48.10) | 107.5 (15.68) | 1.04 | 1.93 (-7.76 – 82.31) | 0.09 |
| Salivary cortisol (pg/mL | 0.21 (0.14) | 0.22 (0.13) | -0.07 | - 0.02 (-0.17 – 0.17) | 0.98 |
| Testosterone/Cortisol concentration ratio (pg/mL) | 1062 (835) | 599.3 (256.1) | 0.75 | 1.39 (-317.3 – 1.24) | 0.21 |
| **After Training** | | | | | |
| Muscle Strength (Kgf) | 24.06 (2.6) | 23.60 (5.9) | 0.10 | 0.20 (-4.66 – 5.60) | 0.84 |
| Plasma BDNF concentration (pg/mL) | 3630 (948.1) | 3013 (632.9) | 0.77 | 1.50 (-557.7 – 1506) | 0.16 |

For Peer Review

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Salivary testosterone (pg/mL) | 77.79 (36.23) | 101.6 (18.55) | -0.83 | -1.52 (-59.07 – 11.49) | 0.16 |
| Salivary cortisol (pg/mL) | 0.17 (0.12) | 0.26 (0.17) | -0.61 | -1.02 (-0.27 – 0.10) | 0.34 |
| Testosterone/Cortisol concentration ratio (pg/mL) | 1579 (2252) | 580.5 (339) | 0.62 | 1.16 (-1.09 – 3.08) | 0.29 |
| **Delta Values** | | | | | |
| Muscle Strength (Kgf) | 2.17 (2.39) | -1.66 (3.29) | 1.33 | 2.55 (0.58 – 7.08) | 0.02* |
| Plasma BDNF concentration (pg/mL) | 264.9 (1804) | -1985 (1842) | 1.23 | 2.38 (210 – 4289) | 0.03* |
| Testosterone/Cortisol concentration ratio (pg/mL) | 636.2 (856.8) | 1115 (2.21) | -0.79 | -0.53 (-2.46 – 1.50) | 0.61 |

For Peer Review

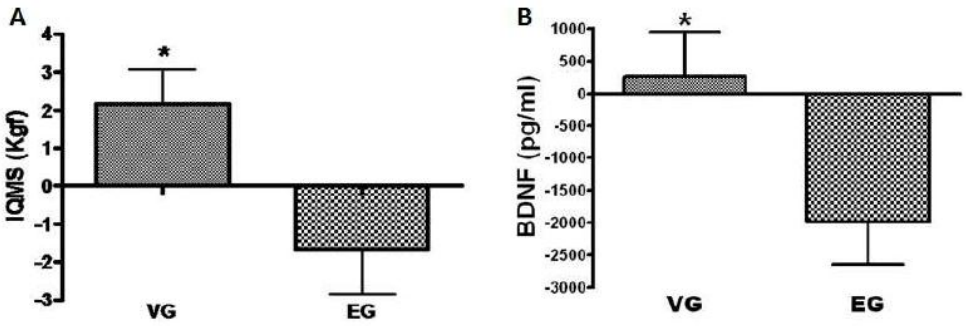



Figure 2 a) The change in isometric quadriceps muscle strength (IQMS) before and after the intervention period (delta = Δ) in the vibration group (VG) and exercise group (EG). The data are presented as the mean and standard deviation. *VG is significantly different from EG, $p \leq 0.05$. b) The change in plasma BDNF concentrations before and after the intervention period (delta = Δ) in the vibration group (VG) and the exercise group (EG). The data are presented as the mean and standard deviation. *VG is significantly different from EG, $p \leq 0.05$

For Peer Review

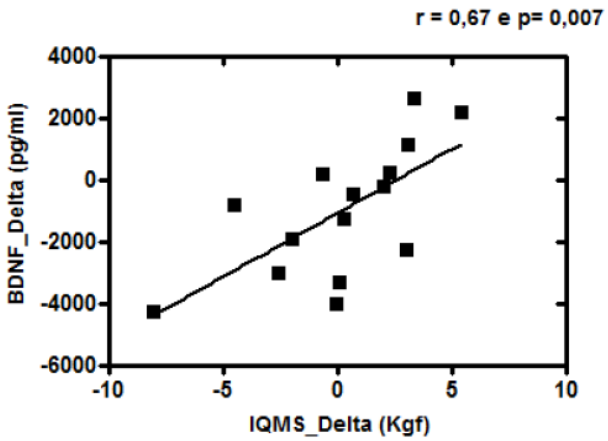



Figure 3 Scattergram showing the positive correlation between delta values (Δ) of the isometric quadriceps muscle strength (IQMS) and the plasma concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in elderly woman with osteoarthritis (OA) of the knee.

For Peer Review

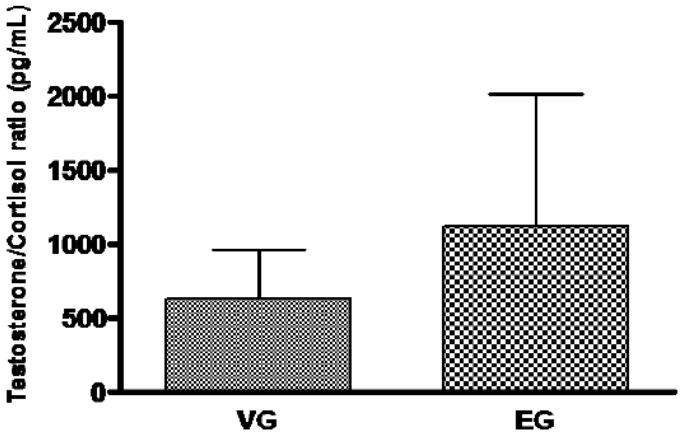



Figure 4 The change in testosterone/cortisol ratios [basal levels before and after the intervention period (delta = Δ)] in the vibration group (VG) and the exercise group (EG). The data are presented as the mean and standard deviation. *VG is significantly different from EG, $p \leq 0.05$.

For Peer Review

**7.4 Artigo 3:**

Artigo submetido Rheumatology International

Fator de impacto: 2.21

Qualis Ciências Biológicas II: B2

Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations)

# INVOLVEMENT OF BDNF IN KNEE OSTEOARTHRITIS: THE RELATIONSHIP WITH INFLAMMATION AND CLINICAL PARAMETERS

--Manuscript Draft--

| | |
|---|---|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | INVOLVEMENT OF BDNF IN KNEE OSTEOARTHRITIS: THE RELATIONSHIP WITH INFLAMMATION AND CLINICAL PARAMETERS |
| Article Type: | Short Communication |
| Corresponding Author: | Adriano Prado Simão, M.D<br>Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys<br>Diamantina, Minas Gerais BRAZIL |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Adriano Prado Simão, M.D |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Adriano Prado Simão, M.D |
| | Vanessa Amaral Mendonça, PhD |
| | Tássio Málber de Oliveira Almeida, Jr |
| | Sérgio Antunes Santos, Dr |
| | Wellington Fabiano Gomes, Msc |
| | Cândido Celso Coimbra, PhD |
| | Ana Cristina Rodrigues Lacerda, PhD |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Abstract: | The aim of this study was to analyze the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in both the plasma and synovial fluid of patients with primary knee osteoarthritis compared to control individuals and to investigate the relationship between BDNF levels and self-reported pain. Twenty-seven patients with knee osteoarthritis (OA) and 19 healthy subjects were enrolled in the study. Anteroposterior knee radiographs were taken to determine the disease severity of the affected knee. Radiographic grading of OA in the knee was performed using the Kellgren-Lawrence criteria. The BDNF levels in the plasma and synovial fluid were measured by ELISA. The mean plasma BDNF levels of the knee OA patients were significantly higher than that of the healthy controls (2378±1067.2 vs. 1756±804.3 pg/mL, $p<0.05$). BDNF levels in the synovial fluid of OA patients (358.9±178.4 pg/mL) were 6-fold lower than in corresponding blood samples ($p<0.0001$) and 4-fold lower than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). Subsequent analyses showed that the plasma BDNF levels significantly correlated with self-reported pain [WOMAC] ($rs=0.39$, $p=0.04$). Furthermore, no correlation was found between the plasma and synovial fluid BDNF concentrations and knee OA severity. The findings of this study suggest that systemic BDNF levels are most likely associated with the mechanism of joint pain in knee OA. |

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Title Page

Adriano Prado Simão[1*]; Vanessa Amaral Mendonça[1]; Tássio Málber de Oliveira Almeida[1]; Sérgio Antunes Santos[2]; Wellington Fabiano Gomes[1]; Candido Celso Coimbra[3]; Ana Cristina Rodrigues Lacerda[1].

**INVOLVEMENT OF BDNF IN KNEE OSTEOARTHRITIS: THE RELATIONSHIP WITH INFLAMMATION AND CLINICAL PARAMETERS**

[1] Integrated Center for Graduate Studies and Research Health (CIPq-Health), Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

[2] Hospital Nossa Senhora da Saúde, Diamantina, Minas gerais, Brazil.

[3] Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

* **Corresponding Adress**

Adriano Prado SImão

School of Health and Biological Sciences, Exercise Physiology Laboratory, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM)

Gloria's Street # 187, DownTown, 39100-000 Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: +55 (38) 35321239

Fax: +55 (038) 35313808

**E-mail:** adrianopsimao@ig.com.br

# INVOLVEMENT OF BDNF IN KNEE OSTEOARTHRITIS: THE RELATIONSHIP WITH INFLAMMATION AND CLINICAL PARAMETERS


## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in both the plasma and synovial fluid of patients with primary knee osteoarthritis compared to control individuals and to investigate the relationship between BDNF levels and self-reported pain. Twenty-seven patients with knee osteoarthritis (OA) and 19 healthy subjects were enrolled in the study. Anteroposterior knee radiographs were taken to determine the disease severity of the affected knee. Radiographic grading of OA in the knee was performed using the Kellgren-Lawrence criteria. The BDNF levels in the plasma and synovial fluid were measured by ELISA. The mean plasma BDNF levels of the knee OA patients were significantly higher than that of the healthy controls (2378±1067.2 vs. 1756±804.3 pg/mL, $p<0.05$). BDNF levels in the synovial fluid of OA patients (358.9±178.4 pg/mL) were 6-fold lower than in corresponding blood samples ($p<0.0001$) and 4-fold lower than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). Subsequent analyses showed that the plasma BDNF levels significantly correlated with self-reported pain [WOMAC] ($r_s=0.39$, $p=0.04$). Furthermore, no correlation was found between the plasma and synovial fluid BDNF concentrations and knee OA severity. The findings of this study suggest that systemic BDNF levels are most likely associated with the mechanism of joint pain in knee OA.


**Keywords:** Brain-derived neurotrophic factor, Knee, Osteoarthritis, Synovial fluid.

Osteoarthritis (OA) is a chronic progressive degenerative joint disease that involves not only articular cartilage but also synovium, subchondral bone, and the surrounding muscles and ligaments. OA is characterized by cartilage destruction, subchondral bone sclerosis, and osteophyte or cyst formation. Knee osteoarthritis is a major cause of severe pain, joint stiffness, limited motion, and disability [1-2]. Previous studies have suggested that neurotrophins are involved in arthritic processes [3-6]. The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is reported to be involved in the joint inflammatory process, and its production is increased in response to pro-inflammatory cytokines [4].

The role of neurotrophins as important factors in arthritis has been discussed previously [4,7]. High BDNF mRNA expression levels as well as the expression of the receptors TrkB and p75NTR have been detected in the synovial fluid cells of OA, rheumatoid arthritis (RA) and spondyloarthritis patients [8]. Furthermore, positive immunostaining for BDNF, TrkB and p75NTR in synovial tissue sections of OA and RA patients has been reported [3]. TrkB was detected in nerve fibers in synovial tissue sections of knee OA and RA patients [3]. In addition, TrkB expression has been found in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in the knee joints of local injection-induced mice [4]. Previous studies have reported increased amounts of BDNF immunostaining in fibroblasts and macrophages from the synovial tissue of OA and RA patients compared to healthy controls [9]. Evidence that synovial fibroblasts actively secrete BDNF when exposed to increased levels of ATP, a signal of inflamed and damaged tissue, was a novel discovery [6]. BDNF is known as a crucial neuromodulator involved in nociceptive hypersensitivity in the central nervous system [6,10], and BDNF levels are modified in some persistent pain states and during inflammation [11-12]. Our group has previously investigated the plasma BDNF levels in elderly individuals with knee osteoarthritis and found a positive effect of aerobic exercise training on plasma BDNF levels and clinical parameters such as pain perception [13]. Moreover, the addition of whole body vibration to squat exercise training also increased BDNF plasma levels and improved lower limb muscle performance in elderly women with knee OA [unpublished data].

In this study, we postulated that elevated BDNF levels in the plasma and synovial fluid might be associated with pain perception in knee OA patients. Therefore, the objective of this study was to analyze the concentrations of BDNF in both the plasma and synovial fluid of patients with primary knee osteoarthritis and compare the results with those of the control individuals, as well as to investigate the relationship between BDNF levels and self-reported pain.

**Methods**

Subjects

We enrolled 27 patients (17 females and 10 males) who met the American College of Rheumatology criteria for knee osteoarthritis (OA group) and 19 healthy individuals (11 females and 8 males) with no radiographic hip OA or knee OA, as indicated by KL grades of 0 for both hips and both knees (Control group). Participants were excluded on the basis of having arthropathy due to gout, pseudogout, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, previous knee injury or previous joint infection. Patients with any systemic inflammatory or autoimmune disorders or any type of malignant or chronic illnesses were not included in this study. Ethical approval of this study was obtained from the Internal Review Board of the University Federal of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (#029/11). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was received from the patients and healthy volunteers prior to their participation in the study.

Procedures

First, the volunteers received a detailed explanation about the objectives and procedures of the study. Then, the volunteers signed a consent form, and their demographic data as well as self-reported levels of pain, stiffness, and physical function were collected. Patients in the OA group were subjected to synovial fluid aspiration from the affected knee using sterile knee puncture by experienced orthopedic physicians. No synovial fluid was extracted from the controls due to ethical concerns. Venous blood samples were collected from all participants and were centrifuged and stored at −80°C until used.

Radiographic evaluation

To ensure that the participants had knee OA and to reliably standardize the samples, radiological evaluations were performed on all volunteers. The severity of the disease was determined using weight-bearing anteroposterior radiographs of the affected knee. Knee radiographs were evaluated according to the Kellgren and Lawrence classification [14]: grade 1, doubtful narrowing of the joint space and possible

osteophytic lipping; grade 2, definite osteophytes and possible narrowing of the joint space; grade 3, moderate multiple osteophytes, definite narrowing of the joint space, some sclerosis and possible deformity of the bone contour; grade 4, large osteophytes, marked narrowing of the joint space, severe sclerosis and definite deformity of the bone contour. A grade 2 classification (definite osteophytes and possible narrowing of the joint space) was used as the cutoff to determine knee OA. The controls were defined as having no radiographic evidence of hip or knee OA, as indicated by KL grades of 0 for both hips and both knees. The grading of the more severely affected knee in each patient was used for data analysis.

Clinical and functional parameters

Self-reported levels of pain, stiffness and physical function were assessed with the 24-item questionnaire from the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) [15], which is a valid and reliable instrument for OA. This questionnaire was translated and adapted to Portuguese [16]. The WOMAC questionnaire aims to measure health status and assess a patient's self-perception of pain (5 questions), joint stiffness (2 questions), and functional performance (17 questions) during the previous 72 h. The WOMAC score was presented to patients on a Likert-type scale, where questions received a score of 0, 25, 50, 75, or 100 for no pain, a little pain, moderate pain, intense pain, and very intense pain, respectively [15]. A higher score on the WOMAC scale represents poorer function or greater pain.

Laboratory analyses

Double-blinded quantitative measurements of plasma and synovial fluid BDNF levels were performed using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the protocol provided by the manufacturer. The detection limit for this assay was 5 pg/mL.

Statistical analyses

Demographic data of volunteer patients and controls were compared using unpaired Student's t tests where appropriate. Comparisons between the groups were performed using one-way analysis of variance

(ANOVA) with Tukey's post hoc test if ANOVA showed significance. Correlations between plasma and synovial fluid BDNF levels and disease severity were assessed using Spearman's correlation coefficient ($r_s$). Data were expressed as the mean ± standard error of the mean. P-values<0.05 were considered statistically significant for differences and correlations.

**Results**

Twenty-seven knee OA patients, aged 56 to 88 years, and 19 healthy individuals, aged 59 to 86 years, were recruited for this study. There were no statistically significant differences between the groups for any parameters assessed (**Table 1**).

As shown in **Fig.1**, plasma BDNF levels were lower in healthy participants than in OA patients (1756±804.3 pg/mL vs. 2378±1067.2 pg/mL, p=0.03). BDNF levels in the synovial fluid of the OA patients (358.9±178.4 pg/mL) were 6-fold lower than in the corresponding blood samples (p<0.0001) and 4-fold lower than in the plasma of the healthy controls (p<0.0001).

There was a moderate positive correlation between BDNF plasma concentration and self-reported pain levels [WOMAC] ($r_s$=0.39, p=0.04) **(Fig.2)**.

With regard to the radiological KL classification, patients were categorized into 2 groups for OA grading. Fifteen patients were classified as grade 2, and 12 patients were classified as grade 3. In addition, the associations between plasma and synovial fluid BDNF levels and osteoarthritis disease severity were investigated. No correlation was found between plasma and synovial fluid BDNF concentrations and knee OA severity.

**Discussion**

Previous studies have demonstrated that BDNF is present in the synovial fluid of inflamed joints in patients with spondyloarthritis [5], RA [5-6] and OA [5-6]. However, gaps remain in the literature with regard to the differences in BDNF levels in the plasma and synovial fluid of elderly patients with knee OA compared to that of healthy controls. Furthermore, it remains unclear whether there is any relationship between BDNF levels and clinical parameters such as self-reported pain. This study is the first to demonstrate the presence of BDNF in both the plasma and synovial fluid of all patients with primary knee OA. The BDNF levels in the synovial fluid of OA patients were 6-fold lower than in the

corresponding blood samples and 4-fold lower than in the plasma of healthy controls. Moreover, there was a positive correlation between BDNF levels and self-reported pain.

Although patients with knee osteoarthritis had markedly higher plasma BDNF levels than synovial fluid BDNF levels, there was no correlation between these concentrations. The study of Rihl et al. [5] also showed no significant correlation between BDNF levels in the serum and synovial fluid in patients with OA and spondylosis. These authors commented that the lack of correlation may be related to the fact that the BDNF found in the synovial fluid is produced locally by chondrocytes, with autocrine and paracrine roles in the joint cartilage, in response to the joint inflammation process [6,17].

Another finding of this study was that the plasma concentration of BDNF in healthy elderly patients was lower than in elderly patients with knee OA. This finding is contrary to the study of Rihl et al. [5], which found a higher plasma concentration of BDNF in healthy subjects compared to patients with spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and osteoarthritis. One possible explanation for the difference between the studies may be related to the stage of the inflammatory process in OA patients. The patients in the OA group in the study by Rihl et al. [5] were in the remission phase of OA, while patients with OA in our study were in an acute phase of the inflammatory process and presented with considerable joint effusion, which justified the clinical conduct of synovial fluid puncture for symptomatic relief.

The BDNF levels in the plasma correlated positively with self-reported pain in patients with knee OA. This finding is supported by the literature, as Grimsholm et al. [3] found that the expression of BDNF in AR and OA patients has not only neuroprotective but also pain-mediating effects.

This study had some inherent shortcomings. First, the investigation was a single-center trial with a relatively small number of participants. Additional studies conducted on random sets of patients from multiple centers with larger sample sizes are warranted to validate our results. Second, BDNF levels were only measured in the plasma and synovial fluid. Further studies analyzing BDNF expression in local tissues, in relation to the synovial and circulating BDNF levels, could provide a more valuable insight into the pathogenic role of BDNF in OA. Third, for ethical reasons, synovial fluid samples from healthy controls were not taken. Fourth, patients with knee OA were sampled in the acute articular inflammation stage. Our conclusions thus cannot be extended to patients in the remission stage of OA. Last, as this was a cross-sectional study, determining definite cause-and-effect relationships might not be possible. Prospective longitudinal investigations are needed to demonstrate disease progression and determine the exact role of BDNF in knee OA.

**Conclusion**

In conclusion, this study revealed that plasma BDNF was significantly elevated in patients with knee OA compared to healthy controls and that the BDNF concentration in the synovial fluid was remarkably lower than that in the paired plasma samples. Furthermore, synovial fluid BDNF levels were greatly reduced compared to the paired plasma BDNF levels.

This study also investigated the relationship between plasma and synovial fluid BDNF levels and clinical parameters. A positive correlation was found between plasma BDNF levels and self-reported pain in knee OA patients. Whether high BDNF levels in the plasma and low BDNF levels in the synovial fluid of OA patients are a consequence of or contributory factors to the disease needs to be elucidated. Further longitudinal investigations are warranted to elucidate the influence of BDNF on the disease outcome.

**Conflicts of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Acknowledgments**

CAPES, CNPq, FAPEMIG, SBFis, and Nossa Senhora da Saúde Hospital.

**References**

1. Nguyen US, Zhang Y, Zhu Y, Niu J, Zhang B, Felson DT (2011) Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data. Ann Intern Med 155(11):725–732. doi: 10.7326/0003-4819-155-11-201112060-00004.

2. Kidd BL (2006) Osteoarthritis and joint pain. Pain 123:6-9.

3. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Forsgren S (2008) Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. Cells Tissues Organs. 188:299-309.

4. Grimsholm O, Dahlqvist SR, Dalén T, Forsgren S (2008) BDNF in RA: Downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters. Clin Rheumatol. 27:1289-1297.

5. Rihl M, Kruithof E, Barthel C, De Keyser F, Veys EM, Zeidler H, Yu DTY, Kuipers JG, Baeten D (2005) Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment. Ann Rheum Dis. 64:1542-1549.

6. Klein K, Aeschlimann A, Jordan S, Gay R, Gay S, Sprott H (2012) ATP induced brain-derived neurotrophic factor expression and release from osteoarthritis synovial fibroblasts is mediated by purinergic receptor P2X4. PLos One. doi:10.1371/journal.pone.0036693

7. Forsgren S (2009) New data favouring that neurotrophins are of importance in arthritis. Arthritis Res Ther 11: 122. doi: 10.1186/ar2754

8. Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, Schmidt RE, Bernateck M, Zeidler H, Tak PP, Baeten D, Rihl M (2009) Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. Arthritis Res Ther 11: R82. doi: 10.1186/ar2716

9. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J, Straub RH (2005) Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. Ann Rheum Dis 64:13–20.

10. Vanelderen P, Rouwette T, Kozicz T, Roubos E, Van Zundert, Heylen R, Vissers K (2010) The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. Eur J Pain 14:471-479.

11. Yang J, Yu Y, Yu H, Zuo X, Liu C, Gao L, Chen ZY, Li Y (2010) The role of brain-derived neurotrophic factor in experimental inflammation of mouse gut. Eur J Pain 14:574-579.

12. Delafoy L, Gelot A, Ardid D, Eschalier A, Bertrand C, Doherty AM, Diop L (2006) Interactive involvement of brain derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and calcitonin gene related peptide in colonic hypersensitivity in the rat. Gut 55:940-945.

13. Gomes WF, Lacerda AC, Mendonça VA, Arrieiro AN, Fonseca SF, Amorim MR, Teixeira AL, Teixeira MM, Miranda AS, Coimbra CC, Brito-Melo GE (2013) Effect of exercise on the plasma BDNF levels in elderly women with knee osteoarthritis. Rheumatol Int. doi:10.1007/s00296-013-2786-0

14. Kellgren JH, Lawrence JS (1957) Radiological assessment of osteo-arthrosis. Ann Rheum Dis 16(4):494-502.

15. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW (1988) Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. J Rheumatol 15(12):1833-1840.

16. Fernandes MI (2002) Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para a osteoartrose WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthtis Index) para a língua portuguesa. Dissertation, Universidade Federal de São Paulo.

17. Yamashiro T, Fukunaga T, Yamashita K, Kobashi N, Takano-Yamamoto T (2001) Gene

and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage.
Bone 28:404–409.

## List of Figures

**Fig.1** BDNF levels in plasma and synovial fluid in patients with OA and healthy controls.

**Fig.2** Positive correlation between plasma BDNF levels in patients with knee OA and self-reported pain (WOMAC) ($r_s$=0.39, p=0.04).

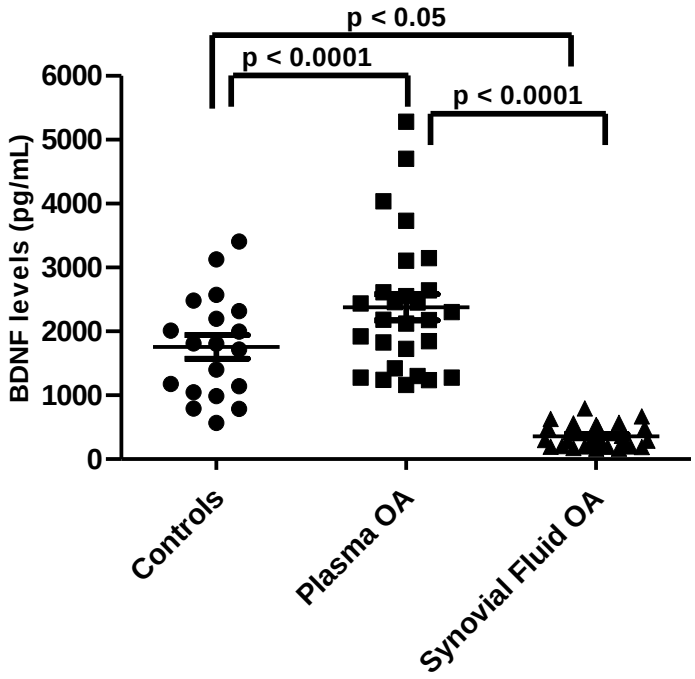



**Fig.1** BDNF levels in plasma and synovial fluid in patients with OA and healthy controls.

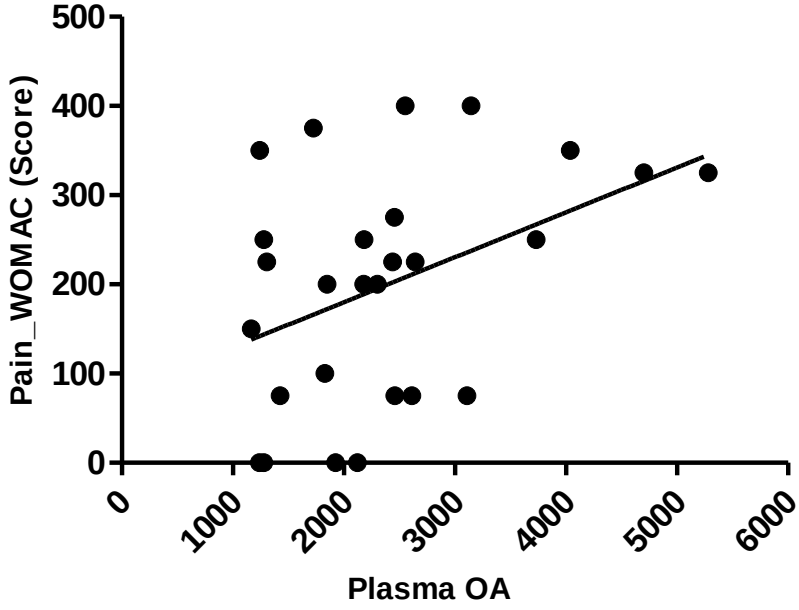



**Fig.2** Positive correlation between plasma BDNF levels in patients with knee OA and selfreported pain (WOMAC) ($r_s$=0.39, p=0.04).

**Table 1.** Sample characterization of the OA and control groups. Data presented as means (SD).

| Characteristics | AO group (N= 27) | | Control group (N= 19) | p-value |
|---|---|---|---|---|
| Age (years) | 68 (9) | | 72 (8) | 0.06 |
| Body mass (kg) | 70 (10.5) | | 70 (12.3) | 0.87 |
| Height (meters) | 1.65 (0.08) | | 1.64 (0.09) | 0.58 |
| IMC (kg/m$^2$) | 25.62 (3.01) | | 26.15 (3.61) | 0.60 |
| Severity of knee OA (%) | Grade 2 | Grade 3 | — | — |
| | 56 | 44 | | |

* p-value $\leq 0.05$.

**7.5 Artigo 4:**

Artigo submetido Osteoarthritis and Cartilage

Fator de impacto: 4.262

Qualis Ciências Biológicas II: A2

Elsevier Editorial System(tm) for Osteoarthritis and Cartilage
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Soluble TNF receptors are produced at sites of inflammation and are inversely associated with self-reported symptoms (WOMAC) in knee osteoarthritis

Article Type: Manuscript

Keywords: Osteoarthritis; sTNFR1; sTNFR2; Soluble TNF receptors; WOMAC.

Corresponding Author: Dr. Adriano Prado Simão, Msc

Corresponding Author's Institution: Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys

First Author: Adriano Prado Simão, Msc

Order of Authors: Adriano Prado Simão, Msc; Vanessa A Mendonça, PhD; Tássio Málber O Almeida; Sérgio A Santos, Dr; Wellington F Gomes, Msc; Cândido C Coimbra, PhD; Ana Cristina R Lacerda, PhD

Abstract: ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of the study was to analyze the concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 in both plasma and synovial fluid of patients with primary knee osteoarthritis and to determine the possible correlations of plasma and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 with the radiographic grading of knee OA and with self-reported pain, stiffness and physical function.

DESIGN: Samples of plasma taken from the peripheral blood and of synovial fluid taken from the knee of patients with osteoarthritis (OA) were collected (n=27). Anteroposterior knee radiographs were taken to determine disease severity in the affected knee. Radiographic grading of OA in the knee was performed using the Kellgren-Lawrence criteria. Furthermore, plasma was collected from the peripheral blood of 19 healthy individuals, with no radiographic change in the hips and knees. The Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC) questionnaire was used to evaluate self-reported physical function, pain and stiffness. ELISA measured the sTNFR1 and sTNFR2 levels in the plasma and synovial fluid.

RESULTS: This study showed that the sTNFR1 levels in synovial fluid of OA patients (2587±66.12 pg/mL) were 2.5-fold higher than in corresponding blood samples ($p<0.0001$) and were 1.5-fold higher than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). However, the plasma sTNFR2 levels in the patients with knee OA were lower than in healthy controls (2249±126.3 pg/mL vs. 2700±126.3 pg/mL, $p<0.05$), and sTNFR2 levels in synovial fluid of knee OA patients (2021±107.0 pg/mL) were significantly lower than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). Furthermore, sTNFR1 levels were higher in plasma compared with synovial fluid (1091±99.48 pg/mL vs. 2249±126.3 pg/mL, $p<0.0001$), whereas sTNFR2 levels were lower in plasma compared with synovial fluid in patients with knee OA (2587±66.12 pg/mL vs. 2021±107.0 pg/mL). Subsequent analyses showed that synovial fluid sTNFR1 levels were negatively correlated with pain and physical function self-reported (rs-0.6785, $p<0.0001$ and rs-0.4194, $p=0.03$, respectively). However, synovial fluid sTNFR2 levels were negatively correlated with pain and joint stiffness (rs-0.5433, $p=0.01$ and rs-0.4249, $p=0.02$, respectively).

CONCLUSIONS: The findings of this study demonstrated the presence of soluble receptors for TNF-alpha, particularly sTNFR1, in the synovial fluid of patients with primary knee OA and the relationship of these receptors with to clinical parameters.

Suggested Reviewers: Barbara J Nicklas PhD
Forest University School of Medicine
bnicklas@wfubmc.edu

Opposed Reviewers:

# SOLUBLE TNF RECEPTORS ARE PRODUCED AT SITE OF INFLAMMATION AND IS INVERSELY ASSOCIATED WITH SELF-REPORTED SYMPTOMS (WOMAC) IN KNEE OSTEOARTHRITIS

Adriano Prado Simão[1*]; Vanessa Amaral Mendonça[1]; Tássio Málber de Oliveira Almeida[1]; Sérgio Antunes Santos[2]; Wellington Fabiano Gomes[1]; Candido Celso Coimbra[3]; Ana Cristina Rodrigues Lacerda[1].

[1] Integrated Center for Graduate Studies and Research Health (CIPq-Health), Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

[2] Hospital Nossa Senhora da Saúde, Diamantina, Minas gerais, Brazil.

[3] Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Adriano Prado Simão – adrianopsimao@ig.com.br

Vanessa Amaral Mendonça – vaafisio@gmail.com

Tássio Málber de Oliveira Almeida – tassiomalber@hotmail.com

Sérgio Antunes Santos – sergioantunessantos@hotmail.com

Wellington Fabiano Gomes – gomeswf@hotmail.com

Cândido Celso Coimbra – coimbrac@icb.ufmg.br

Ana Cristina Rodrigues Lacerda – lacerdaacr@gmail.com

**Running headline:** Soluble TNFRs and WOMAC in knee OA

* **Corresponding Adress**

Adriano Prado Simão

School of Health and Biological Sciences, Exercise Physiology Laboratory, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM)

Gloria's Street # 187, DownTown, 39100-000 Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: +55 (38) 35321239

Fax: +55 (038) 35313808

**E-mail:** adrianopsimao@ig.com.br

## Abstract

**OBJECTIVE:** The aim of the study was to analyze the concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 in both plasma and synovial fluid of patients with primary knee osteoarthritis and to determine the possible correlations of plasma and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 with the radiographic grading of knee OA and with self-reported pain, stiffness and physical function.

**DESIGN:** Samples of plasma taken from the peripheral blood and of synovial fluid taken from the knee of patients with osteoarthritis (OA) were collected (n=27). Anteroposterior knee radiographs were taken to determine disease severity in the affected knee. Radiographic grading of OA in the knee was performed using the Kellgren-Lawrence criteria. Furthermore, plasma was collected from the peripheral blood of 19 healthy individuals, with no radiographic change in the hips and knees. The Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC) questionnaire was used to evaluate self-reported physical function, pain and stiffness. ELISA measured the sTNFR1 and sTNFR2 levels in the plasma and synovial fluid.

**RESULTS:** This study showed that the sTNFR1 levels in synovial fluid of OA patients (2587±66.12 pg/mL) were 2.5-fold higher than in corresponding blood samples ($p<0.0001$) and were 1.5-fold higher than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). However, the plasma sTNFR2 levels in the patients with knee OA were lower than in healthy controls (2249±126.3 pg/mL vs. 2700±126.3 pg/mL, $p<0.05$), and sTNFR2 levels in synovial fluid of knee OA patients (2021±107.0 pg/mL) were significantly lower than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). Furthermore, sTNFR1 levels were higher in plasma compared with synovial fluid (1091±99.48 pg/mL vs. 2249±126.3 pg/mL, $p<0.0001$), whereas sTNFR2 levels were lower in plasma compared with synovial fluid in patients with knee OA (2587±66.12 pg/mL vs. 2021±107.0 pg/mL). Subsequent analyses showed that synovial fluid sTNFR1 levels were negatively correlated with pain and physical function self-reported ($r_s$-0.6785, $p<0.0001$ and $r_s$-0.4194, $p=0.03$, respectively). However, synovial fluid sTNFR2 levels were negatively correlated with pain and joint stiffness ($r_s$-0.5433, $p=0.01$ and $r_s$-0.4249, $p=0.02$, respectively).

**CONCLUSIONS:** The findings of this study demonstrated the presence of soluble receptors for TNF-alpha, particularly sTNFR1, in the synovial fluid of patients with primary knee OA and the relationship of these receptors with to clinical parameters.


**KEYWORDS:** Osteoarthritis; sTNFR1; sTNFR2; Soluble TNF receptors; WOMAC.

**Soluble TNF receptors are produced at sites of inflammation and are inversely associated with self-reported symptoms (WOMAC) in knee osteoarthritis**

## Introduction

Osteoarthritis (OA) is characterized by cartilage destruction, subchondral bone sclerosis or cyst, and osteophyte formation. Knee osteoarthritis is the major cause of severe pain, joint stiffness, limited motion, and disability (1). Although articular cartilage breakdown is a major characteristic of OA, other joint tissues, including the synovial membrane and subchondral bone, actively participate in the progression of the disease (2). Recent research has considerably improved knowledge of both the factors involved in the development of OA and the mechanisms responsible for its progression. OA is now regarded not as a single disease, but rather as a common final stage of joint failure, the initial stages of which can be triggered and perpetuated by numerous causal factors (2-3).

Nevertheless, the exact sequence of pathological events in OA remains unclear; the temporal relationship between subchondral bone damage, chronic inflammation of synovial tissue and cartilage erosion is still largely unknown. The development and progression of OA are now believed to involve inflammation even in the early stages of the disease (4). Epidemiological studies show a clear link between the progression of tibiofemoral cartilage damage and the presence of a reactive or inflammatory synovium (3) secreting inflammatory factors such as proinflammatory cytokines, which are critical mediators of the disturbed metabolism and enhanced catabolism of joint tissue involved in OA. IL-1β, TNF-alpha and IL-6 seem to be the main proinflammatory cytokines involved in the pathophysiology of OA (2).

TNF-alpha is a pleiotropic cytokine that is considered to be a primary modifier of inflammatory and immune reactions that take place in response to various diseases (5-7). Overproduction or inappropriate expression of TNF-alpha can lead to a variety of pathological conditions (8-9). The biological actions of TNF-alpha occur subsequent to its binding to its specific cell surface receptors (10). These receptors, tumor necrosis factor receptor I (TNFR-I) and tumor necrosis factor receptor II (TNFR-II), which have apparent molecular weights of 55

kDa and 75 kDa, respectively, are immunologically distinct. Although their extracellular domains show similarities, the intracellular domains of TNFR-I and TNFR-II employ different signal transduction pathways. Soluble forms of TNFR-I and TNFR-II (sTNFR-I and sTNFR-II), which can neutralize the biological activities of TNF-alpha, have been identified in human serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (5-6,11), psoriatic arthritis (12), arthritis activity in Behçet's disease (13) and OA in temporomandibular joints (14-15).

These soluble receptors are thought to arise through the shedding of the extracellular domains of the 2 membrane-bound TNF receptors (16). There are reports of correlations between the concentrations of TNF-alpha and its soluble receptors, suggesting that stimuli that enhance TNF-alpha levels also induce shedding of TNF receptors (14,17). Evidence suggests, however, that the shedding of the 2 types of soluble receptors is independently regulated (14,17-18). Both soluble receptors can bind to TNF-alpha in vitro, as well as inhibit its biological activity by competing with cell surface receptors for TNF-alpha binding. Consequently, the shedding of soluble receptors in response to TNF-alpha release could serve as a mechanism for binding and inhibiting the TNF-alpha that is not immediately bound to surface receptors, thus protecting other cells from the effects of TNF-alpha and localizing the inflammatory reaction (14,17).

According to Penninx et al. (19), high levels of soluble TNF receptors in serum were associated with decreased physical function, increased OA symptoms (e.g., pain and stiffness) and worse radiographic scores in elderly obese individuals with knee OA. Recent studies from our group also showed a correlation between plasma levels of soluble receptors for TNF-alpha and functional performance in older adults with knee OA (20-21). Due to the technical difficulty and risk of obtaining the biological samples, studies have examined the behavior of these inflammatory factors in the blood (20-22). However, a gap remains in the literature regarding whether there is correlation between concentration of sTNFR1 and sTNFR2 in plasma and synovial fluid. Furthermore, it is unclear whether the concentration at these 2 sites might be associated with the severity of the disease and/or with pain, stiffness and physical function in self-reported knee OA patients. In this study, we postulated the following: 1) there is

relationship between the local and systemic concentration of sTNFR1 and sTNFR2 in plasma and synovial fluid; and 2) the concentration at these two sites might be associated with the severity of the disease and/or with pain, stiffness and physical function self-reported in knee OA patients. Therefore, the objective of this study was to analyze the concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 in both plasma and synovial fluid of patients with primary knee osteoarthritis and to determine the possible correlations of plasma and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 with the radiographic grading of knee OA and with self-report of pain, stiffness and physical function.

## Materials and methods

### Patients

Twenty-seven patients (17 females and 10 males) who met the criteria of the American College of Rheumatology for knee osteoarthritis (OA group) and 19 healthy individuals (11 females and 8 males) with no radiographic change in the hips and knees as indicated by KL grades of 0 for both hips and both knees (Control group) were enrolled in this study. Participants were excluded on the basis of having arthropathy due to gout, pseudogout rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, hemochromatosis, previous knee injury, or previous joint infection. Patients with any systemic inflammatory or autoimmune disorders or any type of malignant or chronic illnesses were excluded from this study. Ethical approval of this study was obtained from the Internal Review Board of the University Federal of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (#029/11).

### Procedures

First, volunteers received a detailed explanation about the objectives and procedures of the study. Thereafter, they signed a consent form, and their demographic data and self-report of pain, stiffness, and physical function were collected. Finally, patients of the OA group were

subjected to aspiration of the synovial fluid from the affected knee using sterile knee puncture by experienced orthopedic physicians. No synovial fluid was extracted from controls due to ethical concerns. Venous blood samples collected from all participants were centrifuged and stored at −80°C until used

Radiographic evaluation

To ensure that the participants had Knee OA and to reliably standardize the samples, radiological evaluation was performed on all volunteers. The severity of the disease was determined using weight-bearing anteroposterior radiographs of the affected knee. Knee radiographs were evaluated according to the Kellgren and Lawrence classification criteria (23): grade 1, doubtful narrowing of joint space and possible osteophytic lipping; grade 2, definite osteophytes and possible narrowing of joint space; grade 3, moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space, some sclerosis and possible deformity of bone contour; grade 4, large osteophytes, marked narrowing of joint space, severe sclerosis and definite deformity of bone contour. A grade 2 classification (definite osteophytes and possible narrowing of joint space) was used as a cutoff to determine knee OA. Controls were defined as having neither radiographic hip OA nor knee OA, as indicated by KL grades of 0 for both hips and both knees. The grading of more the severely affected knee in each patient was used for data analysis.

Clinical and functional parameters

Pain, stiffness and physical function was self-reported through a 24-item questionnaire from the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) (24), which is a valid and reliable tool for assessing OA. This questionnaire was translated and adapted to Portuguese (25). The WOMAC was developed to measure health status and assess a patient's self-perception of pain (5 questions), joint stiffness (2 questions), and functional performance (17 questions) during the previous 72 h. The WOMAC score was presented on a Likert-type

113 scale where questions received a score of 0, 25, 50, 75, or 100 for no pain, a little pain,
114 moderate pain, intense pain, and very intense pain, respectively (24). A higher score on the
115 WOMAC scale represents poorer function or greater pain.
116
117 Laboratory analyses
118
119 Double-blind quantitative measurement of plasma and synovial fluid TNF-alpha, sTNFR1 and
120 sTNFR2 was performed using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay
121 (ELISA) kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the
122 manufacturer's instructions. The detection limit for this assay was 5 pg/mL for sTNFR1,
123 sTNFR2 and TNF-alpha.
124
125 Statistical analysis
126
127 Demographic and anthropometric data between patients and controls were compared by
128 unpaired Student's t tests where appropriate. Comparisons between the groups were performed
129 using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test if the ANOVA
130 showed significance. Differences between the concentration of sTNFR1 and sTNFR2 in the
131 plasma and synovial fluid were compared by paired Student's t tests. Correlations between
132 plasma and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 and disease severity were assessed using
133 Spearman's correlation coefficient ($r_s$). Data were expressed as a mean ± standard error of the
134 mean. P-values<0.05 were considered to be statistically significant for differences and
135 correlations.
136
137 **Results**
138
139 There were no statistically significant differences among groups for any parameters. In
140 respect to KL criteria, patients were categorized into 2 groups in relation to OA grading. Fifteen

141 patients were classified as grade 2 and twelve as grade 3. In addition, the associations between
142 plasma and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 levels and the disease severity of osteoarthritis
143 were statistically investigated (**Table 1**). No correlations were encountered between the plasma
144 and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 concentrations and knee OA severity. Furthermore,
145 TNF-alpha was not detected in any of the samples analyzed.

146 There was no difference in plasma sTNFR1 levels among patients with knee OA and
147 healthy controls (1091±99.48 pg/mL vs. 1363± 106.7 pg/mL, respectively). However, sTNFR1
148 levels in synovial fluid of OA patients (2658±66.12 pg/mL) were 2.5-fold higher than in
149 corresponding blood samples ($p<0.0001$) and were 1.5-fold higher than in the plasma of healthy
150 controls ($p<0.0001$). There was no correlation between plasma sTNFR1 levels with synovial
151 fluid sTNFR1 levels (**Figure 1 A**). With respect to sTNFR2 levels, plasma sTNFR2 levels in the
152 patients with knee OA were lower than in healthy controls (2249±126.3 pg/mL vs. 2700±126.3
153 pg/mL, $p<0.05$). sTNFR2 levels in synovial fluid of knee OA patients (2021±107.0 pg/mL)
154 were significantly lower than in the plasma of healthy controls ($p<0.0001$). There was no
155 correlation between plasma sTNFR2 levels with synovial fluid sTNFR2 levels (**Figure 1 B**).

156 **Figure 2** shows a significant difference between sTNFR1 and sTNFR2 levels in both
157 plasma (1091±99.48 pg/mL vs. 2249±126.3 pg/mL) and synovial fluid (2587±66.12 pg/mL vs.
158 2021±107.0 pg/mL with $p<0.0001$) in patients with OA of the knee.

159 The association between plasma and synovial fluid levels of sTNFR1 and sTNFR2 with
160 self-reported [WOMAC] pain, joint stiffness and physical function was analyzed. Synovial fluid
161 sTNFR1 levels were negatively correlated with self-reported pain and physical function ($r_s$-
162 0.6785, $p<0.0001$ and $r_s$-0.4194, $p=0.03$, respectively) (**Fig. 3** A and B, respectively). However,
163 synovial fluid sTNFR2 levels were negatively correlated with pain and joint stiffness ($r_s$-0.5433,
164 $p=0.01$ and $r_s$-0.4249, $p=0.02$, respectively) (**Fig. 3** C and D, respectively).

165

166 **Discussion**

167 Previous studies demonstrated that sTNFR1 and sTNFR2 are present in synovial fluid
168 in the inflamed joint in patients with rheumatoid arthritis (5-6,11), in psoriatic arthritis (12) in

arthritis activity in Behçet's disease (13) and OA in temporomandibular joints (14-15). However, neither plasma nor synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 levels in patients with knee OA have been examined, and their correlations with disease severity and self-reported pain, stiffness and physical function have never been specifically determined.

To the best of our knowledge, data on the association between plasma and synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 levels and severity of knee OA and on the correlation of these receptors with self-reported pain, stiffness and physical function in patients with knee OA have not previously been documented. Therefore, this study is the first to show that sTNFR1 and sTNFR2 were detected simultaneously in both plasma and synovial fluid obtained from patients with primary knee OA and that sTNFR1 and sTNFR2 levels in synovial fluid were negatively correlated with self-reported clinical parameters.

Our results demonstrate that there were no differences of plasma levels of sTNFR1 between patients with knee OA and controls. However, plasma sTNFR2 levels were significantly lower in patients with OA compared to controls. Moreover, sTNFR1 levels in the synovial fluid of patients with knee OA was significantly higher compared to sTNFR1 levels in the plasma of the same patients (two times higher) as well compared to sTNFR1 levels in the plasma of the control group (1.5 times). In contrast, sTNFR2 levels in the synovial fluid of patients with knee OA did not differ from sTNFR2 levels in the plasma of the same patients and was significantly lower compared to sTNFR2 levels in the plasma of the control group.

In others joint diseases, as well as in OA, a high level of sTNFRs has been shown to be important in the cytokine network, as the biological activity of cytokines depends on binding to specific membrane receptors on target cells (15). Thus, soluble receptors, such as sTNFR1 and sTNFR2, can act as cytokine antagonists, blocking the interaction of the cytokine with its target cell by competing with the membrane receptor for cytokine binding (15,26). In such arthritic conditions, soluble receptors are present in relatively high concentrations, whereas cytokines are either not detectable or are present at low concentrations. These cytokine receptors also exhibited dose-responsive inhibition or promotion of cytokine signaling. That is, the relative ratio between cytokine and cytokine receptor may influence homeostasis, host defense, and

prognosis of those diseases (15,27). These observations are in agreement with the results of our study, in which, especially in synovial fluid, the sTNFR1 levels were quite high in patients with knee OA while the presence of TNF-alpha was not detected. This finding supports the notion that increased sTNFR1 is a protective reaction that blocks or inhibits the side effects that are exacerbated by secreted TNF-alpha. Because sTNFRs can be upregulated by pro-inflammatory cytokines, such as IL-1b and TNF-alpha, this type of feedback inhibition mechanism seems to be effective in preventing aggressive tissue destruction in knee OA (14).

Because TNF-alpha is an important inducer of the sTNFRs, these receptors are of significant importance in OA. A TNF-alpha-dependent cytokine cascade has been observed in many immune responses, in which inflammation and cytokine inhibitors such as the sTNFRs are also upregulated (13,18,26). Inhibition of TNF-alpha in vitro reduced the actions of many other pro-inflammatory mediators (17,26). These results indicate that the pro-inflammatory cytokines were linked in a network or cascade, with TNF-alpha at its apex (15). Therefore, the presence of increased levels of sTNFR1 and absence of TNF-alpha in the synovial fluid of patients with knee OA suggest that a close connection of these variables may have contributed to the pathological process of the knee OA.

Depending on the presence of various cell types in the synovial fluid of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, the ratio of the sTNFRs in synovial fluid can vary. For example, in osteoarthritis, the synovial fluid of the temporomandibular joint has a higher concentration of sTNFR1 than of sTNFR2 (15). In rheumatoid arthritis, however, the reverse ratio obtains (5-6). Our results suggest that there is an increased local production of sTNFR1 in the OA knee because the level of sTNFR1 synovial fluid was much higher than that observed in plasma samples from the same patients. According to previous studies, high concentrations of sTNFRs in synovial fluid generally indicate local production of these receptors in the nearby joint (13,15). An additional important finding in the present study was that sTNFR1 levels were significantly higher than sTNFR2 levels in synovial fluid. Presumably, this substantial elevation of sTNFR1 in synovial fluid can be attributed to preferential expression of TNFR1 on human articular chondrocytes (27-28).

In this study, the synovial fluid sTNFR1 level was negatively correlated with self-reported symptoms of pain and physical function in patients with knee OA, while the synovial fluid sTNFR2 level was negatively correlated with self-reported symptoms of pain and joint stiffness. In other words, as the sTNFR1 and sTNFR2 concentration decreased, the knee OA symptoms became more severe. These findings reinforce the idea that upregulation of the soluble TNF receptors is a protective measure against the TNF-alpha activity in joint inflammation of patients with knee OA (14-15). However, it no correlation was found between plasma or synovial fluid sTNFR1 and sTNFR2 levels and the severity of knee OA. One explanation for this observation could be that some radiological abnormalities may reflect the normal ageing process of the cartilage, while the pain may represent abnormal degradation and synthesis processes of the cartilage, associated with synovial membrane and subchondral bone injury (29). Another point that cannot be neglected is that our samples came only from patients with grade 2 and 3 knee OA. Given this, the absence of patients with grade 4 OA may have contributed to the lack of a correlation. Notably, other studies, which found a correlation between severity of OA and concentration of biochemical markers, had samples from patients classified with grade 4 knee OA (30-32).

Inevitably, this study had some inherent shortcomings. First, the study was performed as a single-center trial with a relatively small number of participants. Additional study conducted on a random sample of multiple centers with larger sample sizes is warranted to validate our results. However, statistical analyses demonstrated a "large" power as well as effect size (OA sTNFR1 levels in synovial fluid *vs* sTNFR1 levels in plasma: d=3.15 and power >99; OA plasma levels of sTNFR1 vs sTNFR2: d= 2.44 and power >99; OA synovial fluid levels of sTNFR1 vs sTNFR2: d= - 1.67 and power >99). Second, for ethical reasons, synovial fluid samples from healthy controls were not taken. Third, our patients with knee OA were in the acute articular inflammation stage, thus our results cannot be considered for patients in remission stage of knee OA. Last, as this was a cross-sectional study, definite cause and effect relationships cannot be determined. Thus, prospective longitudinal investigations are needed to

demonstrate disease progression and determine the exact role of sTNFR1 and sTNFR2 in knee OA.

In summary, the present study is the first to provide evidence the presence of soluble receptors for TNF-alpha in synovial fluid of patients with primary knee OA and the correlation of these receptors with clinical parameters. The presence of soluble receptors, particularly sTNFR1, in the absence of TNF-alpha in synovial fluid negatively correlated with the WOMAC results, may suggest a joint-protective response in the subjects with knee OA. However, further research is necessary to delineate the mechanisms underlying this association as well as to gain insight into the precise role of sTNFR1 and sTNFR2 in the pathogenesis of chronic degenerative processes in patients with knee OA.

**Acknoledgement**

We are grateful to SBFis, FAPEMIG, CNPq, CAPES and Nossa Senhora da Saúde Hospital Diamantina/MG.

**Authors' contributions**

APS, VAM, CCC and ACRL conceived of the project, participated in the design of the study, of the statistical analysis, in the sequence alignment and drafted the manuscript. APS, TMOA, WFG and SAS participated in the acquisition of data, analysis and interpretation of data. APS, VAM and ACRL drafting the article or revising it critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**References**

1. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum 1995;38:1500–55.
2. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. 2011;7:33-42.
3. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. Osteoarthritis Cartilage 2005;13:361–67.
4. Felson, D. T. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. N. Engl. J. Med 2006; 354:841–48.
5. Steiner G, Studnicka-Benke A, Witzmann G, Hofler E, Smolen J. Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis and osteoarthritis. J Rheumatol 1995;22:406-12.
6. Cope AP, Aderka D, Doherty M, Engelmann H, Gibbons D, Jones AC, et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. Arthritis Rheum 1992;35:1160-9.
7. Partsch G, Wagner E, Leeb BF, Dunky A, Steiner G, Smolen JS. Upregulation of cytokine receptors sTNF-R55, sTNF-R75, andsIL-2R in psoriatic arthritis synovial fluid. J Rheumatol 1998;25: 105-10.
8. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. Immunology 1992;76:20-3.
9. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. Cell 1996;85:307-10.
10. Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, et al. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-

receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. J Rheumatol 1997;24:1985–94.

11. Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, Cylwik JP, Cylwik B, Skowronski J, et al. Circulating tumour necrosis factor a and soluble tumour necrosis factor receptors in patients with different patterns of rheumatoid synovitis. Ann Rheum Dis. 2003;62:472–475.
12. Fiocco U, Oliviero F, Sfriso P, Calabrese F, Lunardi F, Scagliori E, et al. Synovial biomarkers in psoriatic arthritis. J Rheumatol 2012;89:61-4.
13. Turan B, Pfister K, Diener PA, Hell M, Möller B, Boyvat A, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors sTNFR1 and sTNFR2 are produced at sites of inflammation and are markers of arthritis activity in Behçet's disease. Scand J Rheumatol. 2008;37:135-41.
14. Uehara J, Kuboki T, Fujisawa T, Kojima S, Maekawa K, Yatani H. Soluble tumor necrosis factor receptors in synovial fluids from temporomandibular joints with painful anterior disc displacement without reduction and osteoarthritis. Archives of Oral Biology 2004;49:133-42.
15. Kaneyama K, Segami N, Sun W, Sato J, Fujimura K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1β, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2005;99:276-284.
16. Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor α receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. J. Rheumatol. 1994;21: 1710–15.
17. Cope AP, Gibbons DL, Aderka D, Foxwell, BM, Wallach D, Maini RN, et al. Differential regulation of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) by IL-4; Upregulation of P55 and P75 TNF-R on synovial joint mononuclear cells.Cytokine1993;5(3):205-12.
18. Edwards CK, Bendele AM, Reznikov LI, Fantuzzi, Chipala ES, Li L, et al. Soluble human p55 and p75 tumor necrosis fator receptors reverse spontaneous arthritis in transgenic mice

expressing transmembrane tumor necrosis fator alpha. Arthritis and Rheumatism. 2006;54(9):2872-2885.

19. Penninx BW, Abbas H, Ambrosius W, Nicklas BJ, Davis C, Messier SP, et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. J Rheumatol 2004;31(10):2027-31.
20. Gomes WF, Lacerda ACR, Mendonça VA, Arrieiro NA, 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;31:759-766.
21. Simão AP, Avelar NCP, Tossige-Gomes R, Neves CD, Mendonça VA, Miranda AS, et al. Functional performance and inflammatory cytokines after training with squat exercises association with whole-body vibration in elderly with knee osteoarthritis. Arch Phys Med Rehabil 2012; 93: 1692-1700.
22. Santos MLAS, Gomes WF, Pereira DS, Oliveira DMG, Dias JMD, Ferrioli E, et al. Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA). Arch Gerontol Geriat 2011;52 (3):322–26.
23. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. Ann Rheum Dis. 1957;16(4):494-502.
24. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. J Rheumatol 1988;15(12):1833-40.
25. Fernandes MI. Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para a osteoartrose WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthtis Index) para a língua portuguesa [Dissertação]. Universidade Federal de São Paulo, 2002.
26. Cañete JD, Albadejo C, Hernandez MV, Laínez B, Pinto JA, Ramirez J, et al. Clinical significance of high levels of soluble tumour necrosis factor-α receptor-2 produced by alternative splicing in rheumatoid arthritis: a longitudinal prospective cohort study. Rheumatology 2011;50:721-728.

27. Roux-Lombard P, Punzi L, Hasler F, Bas S, Todesco S, Gallati H, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. Arthritis Rheum. 1993;36(4):485-489.

28. Alsalameh S, Mattka B, Al-Ward R. Preferential expression of tumor necrosis factor receptor 55 (TNF-R55) on human articular chondrocytes: selective transcriptional upregulation of TNF-R75 by proinflammatory cytokines interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and basis fibroblast growth factor. J Rheumatol 1999;26:645-53.

29. Fernandes FA, Pucinelli MLC, da Silva NP, Feldman D. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in knee osteoarthritis in a Brazilian population: clinical and radiological correlation. Scand J Rheumatol 2007;36:211–215.

30. Honsawek S, Yuktanandana P, Tanavalee A, Saetan N, Anomasiri W, Parkpian V Correlation between plasma and synovial fluid basic fibroblast growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. Int Orthop. 2012;36(5):981-5.

31. Chayanupatkul M, Honsawek S. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in plasma and synovial fluid is inversely associated with disease severity of knee osteoarthritis. Clinical Biochemistry. 2010;43:1133–1137.

**32.** Honsawek S, Chayanupatkul M, Tanavalee A, Sakdinakiattikoon M, Deepaisarnsakul B, Yuktanandana P, et al. Relationship of plasma and synovial fluid BMP-7 with disease severity in knee osteoarthritis patients: a pilot study. International Orthopaedics (SICOT) 2009;33:1171–1175.

**List of Figures**

**Fig. 1 A**- Soluble tumor necrosis factor receptors 1 (sTNFR1) levels in plasma and synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA) (n=27) and in plasma of healthy controls (n=19); **B**- Soluble tumor necrosis factor receptors 2 (sTNFR2) levels in plasma and synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA) (n=27) and in plasma healthy controls (n=19).

**Fig. 2** Difference between sTNFR1 and sTNFR2 levels in plasma and synovial fluid of the patients with knee osteoarthritis. The horizontal lines (in bold) indicate the average values.

**Fig. 3** Negative correlation between synovial fluid tumor necrosis factor receptor soluble-1 (sTNFR1) levels in patients with knee osteoarthritis (OA) and clinical and functional parameters (WOMAC). **A**-Synovial fluid levels of sTNFR1 negatively correlated with pain (WOMAC); **B**- Synovial fluid levels of sTNFR1 negatively correlated with physical function (WOMAC); **C**- Synovial fluid levels of sTNFR2 negatively correlated with pain (WOMAC); **D**- Synovial fluid levels of sTNFR2 negatively correlated with joint stiffness (WOMAC).

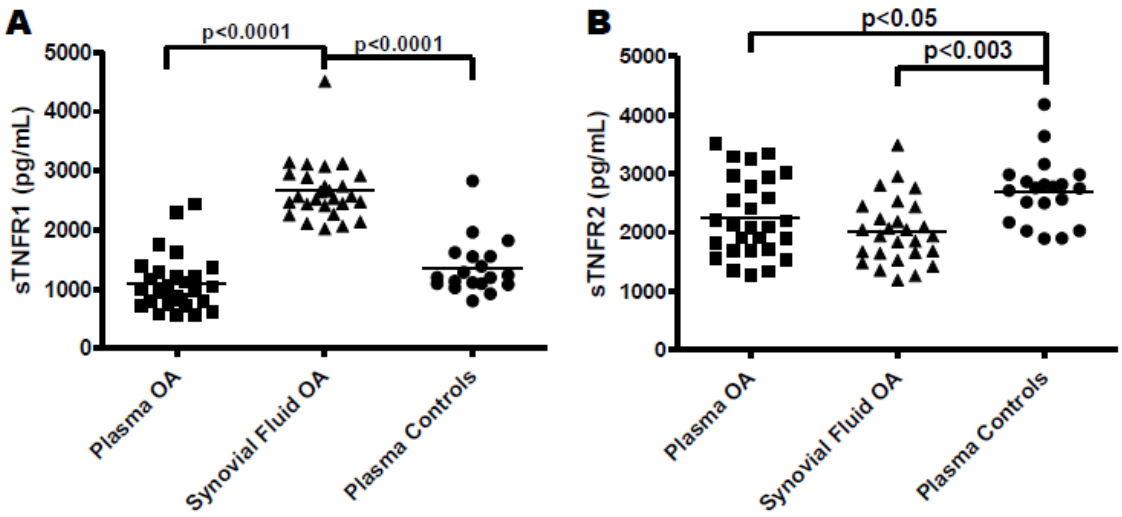



**Fig. 1 A**- Soluble tumor necrosis factor receptors 1 (sTNFR1) levels in plasma and synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA) (n=27) and in plasma of healthy controls (n=19); **B**- Soluble tumor necrosis factor receptors 2 (sTNFR2) levels in plasma and synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA) (n=27) and in plasma healthy controls (n=19). The horizontal lines (in bold) indicate the average values.

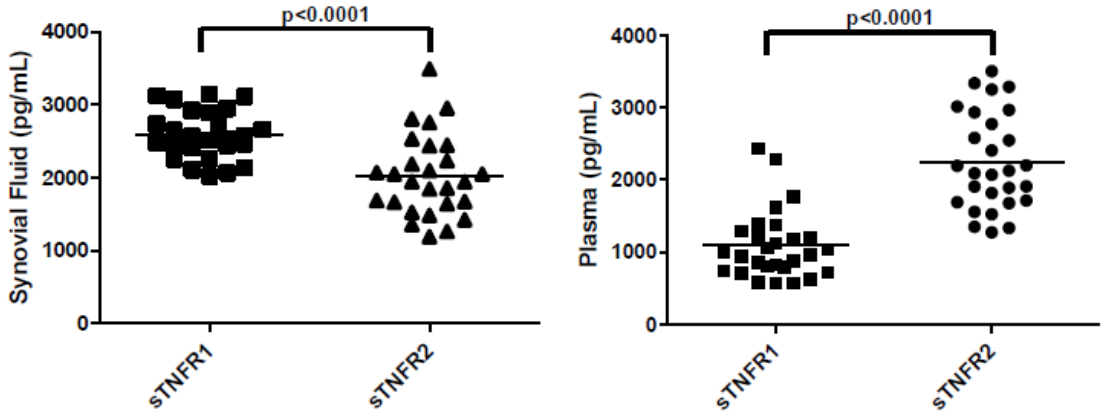



**Fig. 2** Difference between sTNFR1 and sTNFR2 levels in plasma and synovial fluid of the patients with knee osteoarthritis. The horizontal lines (in bold) indicate the average values.

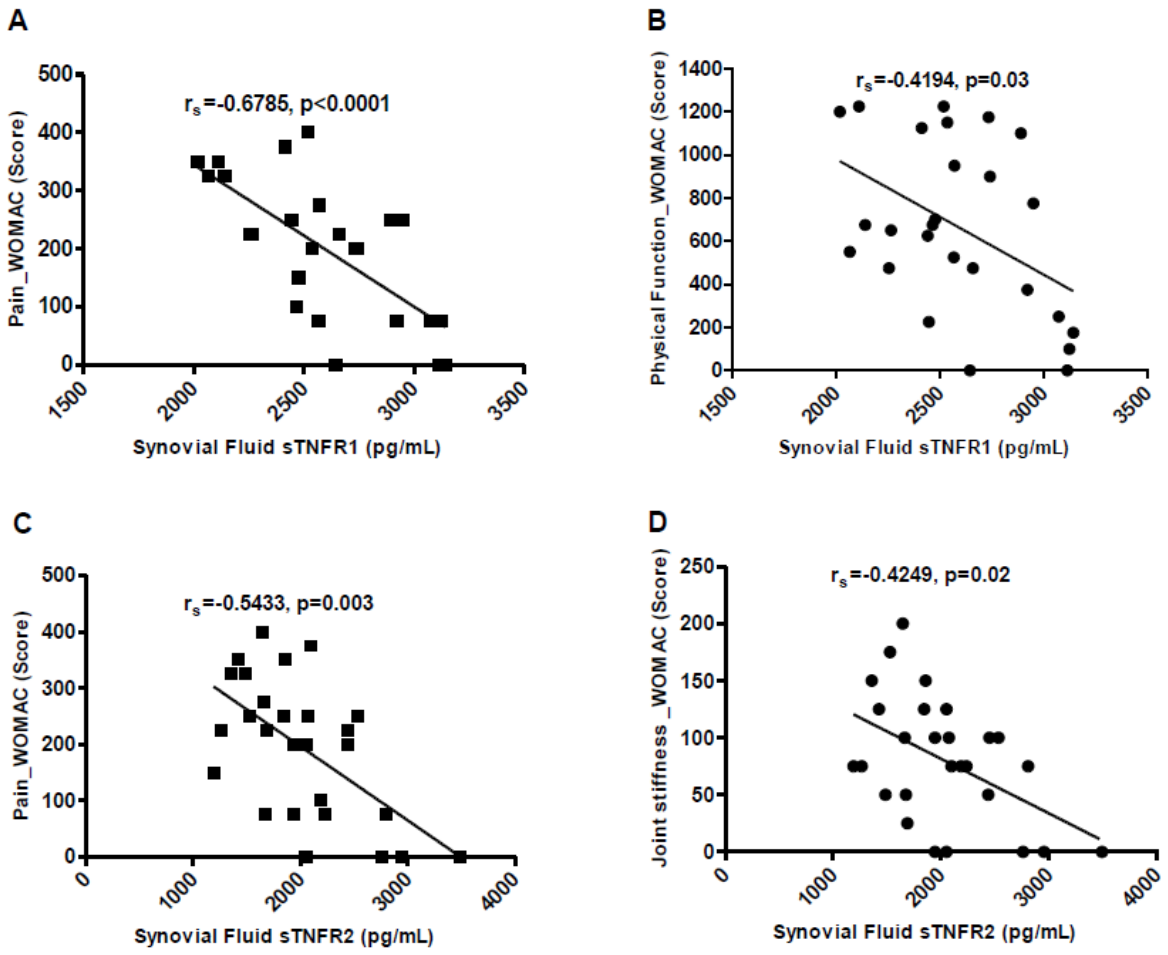



**Fig. 3** Negative correlation between synovial fluid tumor necrosis factor receptor soluble (sTNFR) levels in patients with knee osteoarthritis (OA) and Clinical and functional parameters (WOMAC). **A-** Synovial fluid levels of sTNFR1 negatively correlated with pain (WOMAC); **B-** Synovial fluid levels of sTNFR1 negatively correlated with physical function (WOMAC); **C-** Synovial fluid levels of sTNFR2 negatively correlated with pain (WOMAC); **D-** Synovial fluid levels of sTNFR2 negatively correlated with joint stiffness (WOMAC).

**Table 1:** Sample characterization of the OA group and control group.

| Characteristics | AO group (N= 27) | | Control group (N= 19) | p-value |
|---|---|---|---|---|
| Age (years) | 68 (9) | | 72 (8) | 0.06 |
| Body mass (kg) | 70 (10.5) | | 70 (12.3) | 0.87 |
| Height (meters) | 1.65 (0.08) | | 1.64 (0.09) | 0.58 |
| BMI (kg/m$^2$) | 25.62 (3.01) | | 26.15 (3.61) | 0.60 |
| Severity of knee OA* | 2 | 3 | | |
| (%) | 56 | 44 | — | — |

Data presented as means (SD). * p-value $\leq$ 0.05.

BMI – Body Mass Index; OA - Osteoarthritis

AMERICAN JOURNAL EXPERTS

# EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

## Manuscript title:

Soluble TNF receptors are produced at site of inflammation and is inversely associated with self-reported symptoms (WOMAC) in knee osteoarthritis

## Authors:

Adriano Prado Simão, Vanessa Amaral Mendonça, Tássio Málber de Oliveira Almeida, Wellington Fabiano Gomes, Cândido Celso Coimbra, Ana Cristina Rodrigues Lacerda

## Date Issued:

October 11, 2013

## Certificate Verification Key:

5788-D7CC-8231-5CA1-291B

This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

*American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.*

## *OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE*

## AUTHORS' DISCLOSURE

Manuscript title **Soluble TNF receptors are produced at site of inflammation and is inversely associated with self-reported symptoms (WOMAC) in knee osteoarthritis**

Corresponding author Adriano Prado Simão

Manuscript number _____

**Authorship**
All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. By signing below each author also verifies that he (she) confirms that neither this manuscript, nor one with substantially similar content, has been submitted, accepted or published elsewhere (except as an abstract). Each manuscript must be accompanied by a declaration of contributions relating to sections (1), (2) and (3) above. This declaration should also name one or more authors who take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to finished article. These declarations will be included in the published manuscript.

**Acknowledgement of other contributors**
All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Such contributors must give their consent to being named. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

**Conflict of interest**
At the end of the manuscript text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and research grants or other funding. Potential conflict of interest is also declared individually by each author on a separate ICMJE form to be submitted with the manuscript (link here to ICMJE form).

**Declaration of Funding**
All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text.

**Role of the funding source**
Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this.