UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LEANDRO ALMEIDA DA SILVA

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE MODERADA INTENSIDADE NO SOLO E NA ÁGUA EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM RATOS WISTAR

CRICIÚMA
2022

LEANDRO ALMEIDA DA SILVA

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE MODERADA INTENSIDADE NO SOLO E NA ÁGUA EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM RATOS WISTAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva, Leandro Almeida da.
Efeito do exercício físico de moderada intensidade no solo e na água em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos Wistar / Leandro Almeida da Silva. – 2022.
68 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Osteoartrite - Tratamento. 2. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos. 3. Exercícios terapêuticos. 4. Estresse oxidativo. 5. Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 616.7223

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

unesc

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DA 153ª DEFESA DE TESE

Ata da **Defesa Pública da Tese de Doutorado de Leandro Almeida da Silva.** No dia 16 (dezesseis) do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e dois às 08h30, reuniram-se via ferramenta digital *Google Meet* os membros da Banca Examinadora, composta pelos (as) senhores (as) professores (as): **Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Vanessa Moraes de Andrade** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Alessandro Haupenthal** (Membro externo – UFSC) e **Dra. Gislaine Tezza Rezin** (Membro Externo – UNISUL), e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de arguirem a tese de Doutorado de **Leandro Almeida da Silva,** subordinada ao título: **"EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE MODERADA INTENSIDADE NO SOLO E NA ÁGUA EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM RATOS WISTAR".** Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube ao candidato, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para avaliação final do candidato. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Tese, declarou **Leandro Almeida da Silva** Aprovado.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA (Orientador)

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO (Membro Relator - UNESC)

Profa. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE (Membro Interno – UNESC)

Prof. Dr. ALESSANDRO HAUPENTHAL (Membro Externo – UFSC)

Profa. Dra. GISLAINE TEZZA REZIN (Membro Externo – UNISUL)

CANDIDATO: Leandro Almeida da Silva.
LEANDRO ALMEIDA DA SILVA

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pelo candidato **LEANDRO ALMEIDA DA SILVA**, sob o título **"EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE MODERADA INTENSIDADE NO SOLO E NA ÁGUA EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM RATOS WISTAR"** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Tese.

Criciúma, SC, 16 de setembro de 2022.

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Interno – UNESC

Prof. Dr. ALESSANDRO HAUPENTHAL
Membro Externo – UFSC

Profa. Dra. GISLAINE TEZZA REZIN
Membro Externo – UNISUL

Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira
Orientador

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A Tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver com adaptações descritas na Resolução n. 7/2015 do Colegiado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Dedico este trabalho aos amores da minha vida: Ritele, Gabriela e Henrique.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer muito à minha família! Inspiração e força motriz para esse trabalho!

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira pelos ensinamentos, obrigado mestre!!

Aos meus colegas de laboratório, ao longo desses anos, meu muito obrigado pela parceria e aprendizados! Agradeço aos professores e funcionários do PPGCS!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A lesão articular traumática induz alterações patológicas que acarretam na deterioração estrutural e funcional da articulação, além de manifestar processo inflamatório. O exercício físico (EF) de moderada intensidade é uma modalidade terapêutica que pode auxiliar na reabilitação do tecido lesionado pela osteoartrite (OA). O objetivo do trabalho foi investigar os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e histológicos do tratamento com exercício físico de moderada intensidade no solo e na água em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos Wistar. No presente estudo, o modelo mecânico de OA foi realizado a partir da ressecção completa dos meniscos mediais.Foram utilizados 48 ratos Wistar machos divididos em: (n=12): Sham (S); Osteoartrite (OA); Osteoartrite + Exercício em solo (OA + ES); Osteoartrite + Exercício em Água (OA + EA). Os animais foram anestesiados e mantidos sob anestesia usando isoflurano 4%. O joelho direito foi tricotomizado, preparado assepticamente para a cirurgia. No 30º dia, após a indução do modelo mecânico de OA, os animais iniciaram os protocolos de exercício físico. O protocolo de solo foi realizado em esteira, em intensidades moderadas, entre 50% e 60% do VO2máx. Já no protocolo aquático, também realizado em moderada intensidade. A sobrecarga se deu em percentuais, que oscilaram entre 3% a 5% do peso corporal. Quarenta e oito horas após o término dos protocolos de exercício, todos animais foram anestesiados e eutanasiados para análise de parâmetros histológicos, moleculares e bioquímicos. Os resultados do presente estudo mostraram que o EF realizado em esteira foi mais efetivo para atenuar a ação de citocians pró-inflamatórias (IFNγ, TNF-α, IL1-β e IL-6) e regulou positivamente as anti-inflamatórias como (IL4, IL10 e TGF-β) em relação aos demais grupos do experimento. Além de manter também um ambiente oxiredutor mais equilibrado dentro da articulação, o EF no solo, proporcionou um desfecho morfológico mais satisfatório com relação ao númenro de condrócitos na avaliação histológica. Como desfecho encontramos melhores parâmetros moleculares, bioquímicos e histológicos nos grupos submetidos ao tratamento com EF, com uma tendência de melhor resposta nos animais que se exercitaram no solo em comparção aos que realizaram a atividade na água.

Palavras-chave: Osteoartrite; Exercício Físico; Inflamação; Estresse oxidativo; Histologia.

ABSTRACT

Traumatic joint injury induces pathological changes that lead to structural and functional deterioration of the joint, in addition to manifesting an inflammatory process. Moderate-intensity physical exercise (PE) is a therapeutic modality that can help in the rehabilitation of tissue injured by osteoarthritis (OA). The objective of this work was to investigate the anti-inflammatory, antioxidant and histological effects of the treatment with moderate intensity physical exercise in soil and water in a mechanical model of osteoarthritis in Wistar rats. In the present study, the mechanical model was made from the complete resection of the medial menisci. We used 48 male Wistar rats divided into: (N=12): Sham (S); Osteoarthritis (OA); Osteoarthritis + Floor Exercise (OA + FE); Osteoarthritis + Exercise in Water (OA + EW). Animals were anesthetized and maintained under anesthesia using 4% isoflurane. The right knee was shaved and aseptically prepared for surgery. On the 30th day, after the induction of the mechanical model of OA, the animals started the physical exercise protocols. The floor protocol was performed on a treadmill, at moderate intensities, between 50% and 60% of VO^2max. In the aquatic protocol, also performed at moderate intensity. The overload occurred in percentages, which ranged from 3% to 5% of body weight. Forty-eight hours after the end of the exercise protocols, all animals were anesthetized and euthanized for analysis of histological, molecular and biochemical parameters. The results of the present study showed that PE performed on a treadmill was more effective in attenuating the action of pro-inflammatory cytokines (IFNγ, TNF-α, IL1-β and IL-6) and positively regulating anti-inflammatory such as (IL4, IL10 and TGF-β) in relation to the other groups in the experiment. In addition to also maintaining a more balanced oxi-reductive environment within the joint, PE on the ground provided a more satisfactory morphological outcome with regard to the number of chondrocytes in the histological evaluation. As an outcome, we found better molecular, biochemical and histological parameters in the groups submitted to the PE treatment, with a tendency of better response in the animals that exercised on the ground compared to those that performed the activity in the water.

Keywords: osteoarthritis; physical exercise; inflammation; oxidative stress; histology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo inflamatório na articulação.....16
Figura 2 - Formação de ERO em condrócitos... 19
Figura 3 - Resumo de alguns mecanismos envolvidos na fisiopatologia da osteoartrite... 22
Figura 4 - Procedimento cirúrgio (meniscectomia) para indução do modelo mecânico de OA... 25
Figura 5 - Protocolo de Exercício Físico no solo... 26
Figura 6 - Protocolo de Exercício Físico na água..... 27
Figura 7 - Cronograma e linha do tempo do experimento... 28
Figura 8 - Atividade dos componentes da cadeia respiratória.... 34
Figura 9 - Oxidantes. 35
Figura 10 - Níveis de dano oxidativo e sistema anti-oxidante.....36
Figura 11 - Citocinas pró- inflamatórias. 37
Figura 12 - Citocinas anti-inflamatórias. 38
Figura 13 - Análise histológica.....39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADANTs	Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CA+2	Cálcio
CAT	Catalase
COX2	Ciclo oxigenase- 2
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DAMP’s	Padrões moleculares associados ao dano
DCFHDA - 2',7'	Diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Exercício físico água
EF	Exercício físico
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ES	Exercício físico solo
GSH	Glutationa reduzida
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceina
H2O2	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular
IFNγ	Interferon γ
IKK	I-kapaB quinase
Il10	Interleucina 10
IL1-RA	Receptor antagonista da IL-1β
IL1-β	Interleucina 1 -β
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL6	Interleucina 6 miócito
iNOS	Oxido nitro sintase
M1	Macrófago de fenótipo tipo 1
M2	Macrófago de fenótipo tipo 2
MAPK	Proteína quinase ativada por glicogênio
MEC	Matriz extra celular

MIA	Iodoacetato monossódico
MMP	Metaloproteinases de matriz
NADPH oxidase	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido
NF-kb	Fator nuclear kappa B
NO	Oxido nítrico
O2	Ânion superóxido
OA	Osteoartrite
OH	Radical hidroxila
OONO	Peroxidonitrito
PGE2	Prostaglandina 2
S	Semana
SDH	Succinato desidrogenase
SH	Sulfidrila
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de crescimento β
Th1	Linfócito T helper 1
TNF –α	Fator de necrose tumoral α
TRL’s	Receptores de membrana do tipo toll

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

1.1 OSTEOARTRITE 12
1.2 OSTEOARTRITE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO 13
1.3 OSTEOARTRITE E O PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ERO 17
1.4 EXERCÍCIO FÍSICO COMO TERAPIA NA OSTEOARTRITE 19

2 OBJETIVOS 23

2.1 OBJETIVO GERAL 23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3 MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS 24
3.2 ANIMAIS 24
3.3 MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE 24
3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO NO SOLO 25
3.5 PROTOCOLO EXERCÍCIO FÍSICO NA ÁGUA 26
3.6 EUTANÁSIA 28
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 28
3.7.1 Metabolismo Energético 28
3.7.2 Estresse oxidativo 29
3.7.2.3.2 Glutationa (GSH) 31
3.7.3 Marcadores inflamatórios 31
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA 32
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 32

4 RESULTADOS 33

4.1 ATIVIDADE DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS 33
4.2 NÍVEIS DE OXIDANTES 34
4.3 NÍVEIS DE DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES 35
4.4 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS 36
4.5 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS 37
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA 38

5 DISCUSSÃO 40

6 CONCLUSÃO 52

ANEXO 1 67

1 INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é considerada uma doença articular crônica degenerativa, relacionada com alterações biomecânicas, estruturais, bioquímicas e moleculares da cartilagem articular (Rios et al., 2018; Green et al., 2018). Caracteriza-se por ser um tecido avascular que extrai seus nutrientes e oxigênio por difusão simples (Shikichi et al., 1999; Iwanaga et al., 2000), formado quase em sua totalidade por matriz extracelular (MEC) e células fisiologicamente ativas encontradas em menor quantidade, denominadas condrócitos.

As superfícies articulares são recobertas pela membrana sinovial, um tecido conjuntivo especializado e responsável pela produção de substância específicas que lubrificam e nutrem a articulação. A disfunção nessa membrana pode contribuir para a instauração da OA (Shikichi et al., 1999).

Atualmente, em torno de 300 milhões de pessoas possuem a patologia (Cisternas et al., 2016; Qin et al., 2017). Sua incidência está diretamente associada à idade, sendo mais frequente em indivíduos acima dos 40 anos, aparentemente relacionada a fatores como: perda de massa muscular, fatotes genéticos, instabilidade articular e traumas (Cisternas et al., 2016; Pritzker, et al., 2006; Robins, et al., 2013; Wittenauer, et al., 2013; Castrogiovanni, et al., 2019).

A fisiopatologia da doença não é amplamente compreendida, embora vários avanços tenham ocorrido nos últimos anos. Acreditava-se que o processo de OA estivesse relacionado somente ao processo de desgaste da cartilagem, percebido ao longo dos anos. Porém, atualmente, sabe-se que a doença apresenta, além dos fatores já descritos, um caráter crônico degenerativo, inflamatório e de desequilíbrio do sistema redox celular (Australia, 2007; Cisternas et al., 2016; Qin et al., 2017; Rios et al., 2018; Green et al., 2018).

Estudos recentes apontam que a instalação e progressão da OA estão ligadas diretamente ao processo inflamatório sinovial e à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Henrotin et al., 2005; Li et al., 2012; Zahan et al., 2020). Outro fator relacionado ao aparecimento de OA é a sobrecarga de peso sobre a articulação. A posição ereta e o movimento natural de caminhada impõem sobre o esqueleto axial grande parte do peso do corpo e essa sobrecarga ao longo dos anos pode promover desgaste articular, o que justifica a elevada incidência de OA no joelho observada em humanos (Gomez e Thurston, 1993; Paździor et al., 2019).

A redução do espaço articular, esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos são percebidos como frequência na OA. Acredita-se que fragmentos da cartilagem ou da articulação possam funcionar como sinalizadores para a resposta inflamatória local, o que em tese, daria início ao processo inflamatório e a uma maior produção de ERO (Sellam e Berenbaum, 2010).

Importantes características biomecânicas da articulação, como elasticidade e compressibilidade, são afetadas durante o processo de OA. Essas alterações podem ocasionar danos ao colágeno, proteoglicanos, presentes na MEC, o qual pode passar a apresentar características fibrosas e consequente perda de função (Linden, 1977; Haubruck et al., 2021).

1.2 OSTEOARTRITE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório pode ser entendido como uma resposta do organismo, que visa proteger e reparar tecidos e células que foram acometidos por algum dano. Essa resposta tem início pela vasodilatação, associada às respostas celulares, sendo mediadas por citocinas, principais componentes do processo inflamatório inicial (Okin e Medzhitov, 2012; Robins, et al., 2013).

O recrutamento das células de defesa, leucócitos (neutrófilos e macrófagos), para o local da inflamação se dá pela ação destas proteínas sinalizadoras - citocinas pró-inflamatórias que reconhecem o agente nocivo, sinalizando o processo de migração de macrófagos de fenótipo (M1) para o tecido lesado, dando início ao processo de fagocitose e de reparo tecidual. A reestruturação do tecido é o desfecho esperado com a ação de citocinas anti-inflamatórias atuando sobre os macrófagos não fagocíticos (M2) para a produção de matriz extracelular (MEC) e seus componentes e fatores de crescimento, encerrando com isso o processo inflamatório. No entanto nem todo processo inflamatório tem como resultado final o reparo desejado, podendo tornar-se crônico e mal resolvido, como observado na osteoartrite (Andreesen et al., 1988; Medzhitov, 2008; Labonte et al., 2014; Ohashi et al., 2015).

A cartilagem articular apresenta características distintas, sendo um tecido avascular, não inervado, de baixa celularidade, composta predominantemente por MEC, em que o colágeno tipo II apresenta importante função estrutural; conferindo ao tecido características de elasticidade e compressibilidade, proporcionando assim, uma superfície lisa com consequente diminuição de atrito articular. Estas características impõem um processo inflamatório um pouco distinto dos demais (Robins, et al., 2013; Ohashi et al., 2015).

Estudos indicam que sinais biomecânicos, moleculares e bioquímicos anormais na cartilagem parecem desencadear o processo de indução da inflamação articular, através da ativação de respostas gerada por citocinas , como os fatores de necrose tumoral (TNF – α) e as interleucinas IL-1 e IL-6 pelos macrófagos M1 (Ragan et al., 1999; Fermor et al., 2001). Os condrócitos, macrófagos, osteoclastos e tecidos sinoviais, induzem também a formação destas substâncias pró-inflamatórias na OA. Além disso, altas concentrações de IL-1, IL-6 e TNF-α são observados no líquido e membrana sinovial de articulações com OA, osso subcondral e cartilagem, regulando positivamente eventos catabólicos de desfecho não fisiológico para o tecido, culminando com danos estruturais às articulações (Clements, et al., 2003; Martel-Pelletier et al., 2005).

A partir desses estímulos patológicos as citocinas pró-inflamatórias retroalimentam positivamente o processo de degradação articular, quando nos condrócitos ocorre a regulação da expressão de genes que codificam a expressão gênica de óxido nitro sintese indutível (iNOS). O óxido nítrico (NO) tem papel fundamental na degradação da cartilagem, pois inibe a síntese de colágeno e proteoglicanos, que são formadores da base da MEC. Essas citocinas pró-inflamatórias atuam positivamente na regulação da síntese de proteínas como a ciclo oxigenase 2 (COX-2) e a prostaglandina 2 (PGE2). Outra ação desempenhada pelas citocinas pró-inflamatórias é a regularização da expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs), que desempenham papel importante na degradação do colágeno tipo II da cartilagem articular e na degradação da MEC (Hsieh et al.,2018).

A IL-1 é uma das principais citocinas pró-inflamatórias que atuam na OA, encontradas em elevadas concentrações na membrana sinovial, osso subcondral e cartilagem artríticas. Uma de suas ações é a inibição a síntese de colágeno tipo II, atuando também na liberação de metaloproteinases (MMPs) e no estímulo à produção de IL-6 na articulação (Lefebvre et al., 1990; Reboul et al., 1996; Guerne et al., 1990; Chadjichristos et al., 2003; Shakibaei et al., 2005).

A IL-6 também é encontrada no líquido sinovial de articulações com OA. O papel da IL-6 na OA é similar ao da IL-1, porém, com menor intensidade. Sua principal ação parece ser na promoção da síntese e liberação de MMPs, promovendo danos aos condrócitos (Kobayashi et al., 2005). Contudo, a IL-6 também é encontrada nos miócitos e nos músculos estriados esqueléticos durante o EF, desempenhando papel anti-inflamatório, caracterizando seu papel pleiotrópio na fisiopatologia da OA, inibindo, por exemplo, a ação do TNF-α na articulação (Kishimoto, 2006).

Na OA, além do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, ocorrem alterações na quantidade e tipo dos elementos da MEC (Sellam e Berenbaum, 2010). Osteoclastos e osteoblastos localizados nos cistos dos ósseos subcondrais são responsáveis por secretar essas citocinas, assim como as MMPs, que desencadeiam e sinalizam ao mesmo tempo o processo inflamatório e por consequência, a manifestação da OA (Sellam e Berenbaum, 2010; Wu et al., 2018).

Histologicamente, nos processos degenerativos articulares podem ser observados desde desorganização até apoptose de condrócitos, fissuras nas zonas superficiais e médias da cartilagem até a desnudação por completo destas áreas, o que acarreta na diminuição por completo do espaço intra-articular. Outros achados incluem também a diminuição do líquido sinovial (Pritzker et al., 2006).

O aumento exponencial de MMPs é responsável pela degradação da matriz extracelular e as consequentes alterações nos padrões de elasticidade, compressibilidade, além de substituição do colágeno tipo II pelos do tipo I, III, IV. Os mecanismos que desencadeiam esses processos continuam sendo alvo de estudos e ainda estão pouco elucidados (Sellam e Berenbaum, 2010; Castrogiovanni et al., 2019).

As duas MMPS mais envolvidas nesse processo são as colagenases e as agrecanases. As primeiras decompõem o colágeno tipo II, sendo que a MMP-13 é considerada a principal metaloproteinase envolvida no processo da OA. Já as agrecanases, ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), gerenciam a degradação dos agrecanos, que determinam a capacidade de resistência da cartilagem ao dano (Troeberg e Nagase, 2012).

Estudos em humanos, utilizando exames de imagem, evidenciaram que durante a hipóxia do osso subcondral - sinal decorrente da OA - vias de sinalização de osteoblastos foram alteradas em função do aporte diminuído de fluxo sanguíneo. Elevação dos mediadores pró-inflamatórios como DCFH, NO e sulfidrilas, MMP3 e MMP13 e síntese e secreção de IL-1 foram evidenciados em cartilagens e condrócitos com OA (McAllister e Frangos, 1999; Wadhwa et al., 2002; Tanaka et al., 2005; Aaron et al., 2017).

Em contrapartida ao processo de dano, existe a resposta anabólica/protetora na cartilagem, que se dá pelo aumento na síntese de fatores de crescimento beta (TGF-β) e ação de citocinas anti-inflamatórias, como IL4 e IL-10, que regulam os efeitos pró-inflamatórios causados na cartilagem. Além disso, como parte da ação protetora dos fatores de crescimento (TGF-β) que possibilita a manutenção da estrutura fisiológica da cartilagem, podem ser observadas a diminuição da ação da IL-1 e TNF-α nos condrócitos, somado à

limitação da expressão de MMPs e supressão da quebra do colágeno tipo II, além da diminuição da apoptose de condrócitos (Moulharat et al., 2004; Tchetina et al., 2007). Um estudo em camundongos analisou o resultado de um agente terapêutico com características anti-inflamatórias, para avaliar o seu potencial efeito protetor. Logo após, os condrócitos desses animais foram expostos à IL-1β, citocina esta que age na liberação e ativação de agentes pró- inflamatórios, evidenciando redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, pela aparente inibição do NF-kB, o qual está relacionado diretamente com a sinalização destas citocinas, assim como, uma diminuição nas concentrações de TNF-α, NO, (iNOX) e COX-2 e na expressão de MMPs (Wu et al., 2018).

Além disso, contínuos traumas mecânicos na articulação podem desencadear o processo inflamatório observado na OA. Em um estudo em humanos foi evidenciado que às alterações no microambiente da cavidade articular pareceram ser capazes de aumentar o processo inflamatório e a apoptose nos condrócitos, contribuindo para o processo de degradação de componentes da MEC, como colágeno tipo II e agrecan (Sellam e Berenbaum, 2010; Thomas et al., 2017). Na figura 01: (A) é possível visualizar uma articulação com anatomia e estruturas saudáveis. Já em (B) é possível preceber a instalação e progressão da OA.

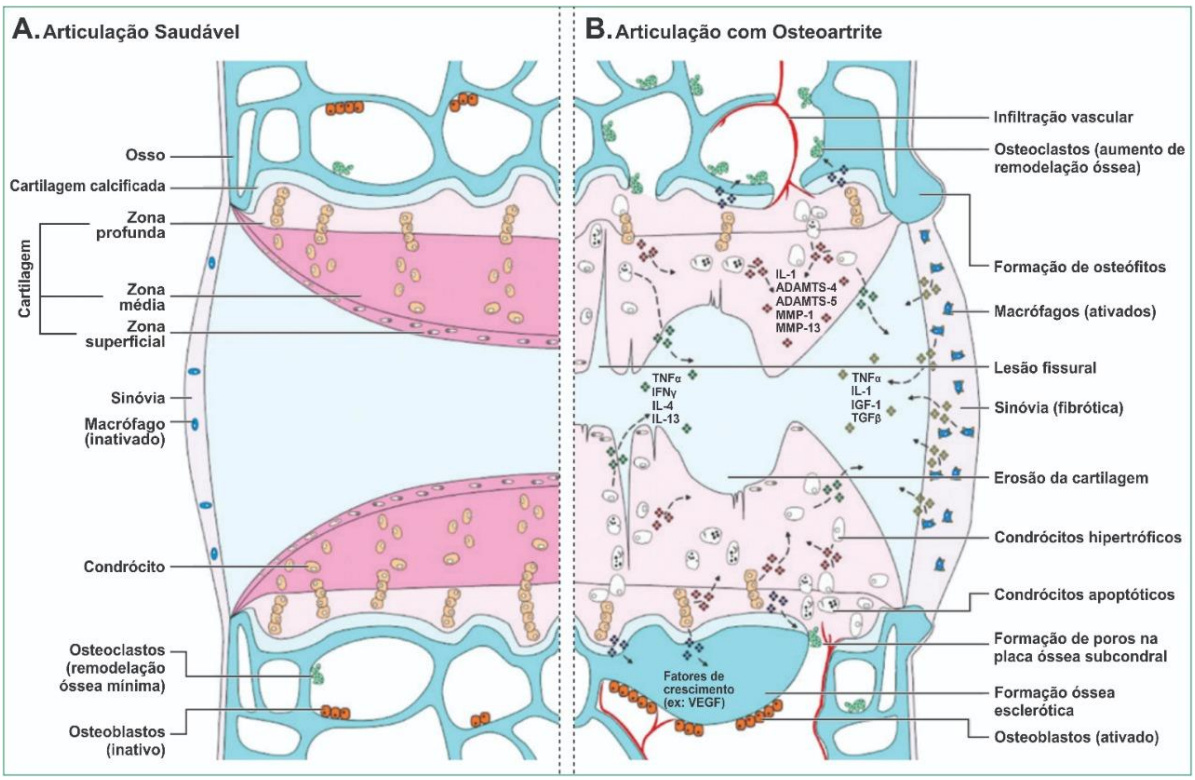

Figura 1 – A figura apresenta a esquerda uma articulação saudável (A), e o processo inflamatório na articulação, a direita (B) (Adpatado de Glyn-Jones, et al., 2015)

1.3 OSTEOARTRITE E O PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ERO

As ERO - Espécies Reativas de Oxigênio, são moléculas ou fragmentos moleculares reativos que contém elétron não pareado em seu orbital mais externo, que tendem a retirar elétrons de outras moléculas para atingir o estado quimicamente mais estável, sendo encontradas em todos sistemas biológicos que tenham o oxigênio presente (Pinho et al., 2015). A literatura descreve a importância do papel das ERO, promovendo dentro de concentrações fisiológicas um importante papel na manutenção ou reestabelecimento das funções celulares, modulando assim, a ação do sistema imunológico e bactericida (Halliwell, 1991; Halliwell e Cross, 1994; Adam-Vizi e Chinopoulos, 2006).

Porém, quando ocorre um excesso de produção de ERO e uma redução da ação do sistema antioxidante, este que desempenha papel de proteção celular, pode haver um comprometimento da homeostase, causando assim, danos a lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (Zahan et al., 2020). A OA é descrita atualmente como uma patologia crônica e inflamatória, e nessas condições ambientais, as células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, geram grandes quantidades de ERO em função da quantidade aumentada de oxigênio necessária no processo de fagocitose, o que eleva a produção local de ERO (Fialkow et al., 2007; Zahan et al., 2020).

Os condrócitos articulares, em situações fisiológicas, apresentam uma adaptação importante, eles realizam suas atividades em um ambiente com baixas concentrações de oxigênio, característica da articulação, o que leva a uma diminuição do seu metabolismo, produzindo poucas EROs (Kühn et al., 2003). Porém, em resposta às variações parciais de oxigênio, estresse mecânico e mediadores pró-inflamatórios, os condrócitos passam a produzir maiores níveis de EROs pela ação da NADPH oxidase (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido) e mitocôndrias destes condrócitos (Turrens, 2003; Gomez-Cabrera et al., 2004; Drevet et al., 2018; Zahan et al., 2020).

A mitocôndria é uma organela responsável pela respiração celular e fonte produtora de ERO nos condrócitos. Grande geradora de energia do nosso sistema muscular esquelético, ela é responsável por ressintetizar a adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP) para produção de substrato para contração muscular, por exemplo. No curso desse processo ocorre a redução sequencial do oxigênio molecular, em água, pela adição de quatro elétrons. Porém, em um pequeno percentual de mitocôndrias, de 2-4% ocorre à produção de ERO pelo escape destes elétrons nos complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE), formando ânion superóxido (O_2-) quando esse oxigênio

recebe somente um elétron; peróxido de hidrogênio (H_2O_2), se receber dois elétrons; e radical hidroxila (OH-), quando receber três elétrons (Chance e Williams, 1955).

A NADPH oxidase, expressa por condrócitos, é a principal fonte de ERO no líquido sinovial (Ostalowska et al., 2006; Regan et al., 2008). Essa enzima catalisa a transferência de elétrons de NADPH para oxigênio molecular para formar superóxido (O_2-) (Tidball, 2005). A produção de superóxido é aumentada devido a elevação da utilização do oxigênio que é necessário dentro do processo de fagocitose pelos macrófagos. Este processo é denominado “explosão respiratória”, ele converte o oxigênio single imediatamente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD) e, finalmente, em radicais hidroxila (OH-) e ácido hipocloroso pela reação de Fenton, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo no interior da articulação (Carlo e Loeser, 2003; Robins, et al., 2003; Tidball, 2005; Soran et al., 2008).

O óxido nítrico (NO), produzido pela óxido nítrico-sintase (iNOS), em resposta a citocinas pró-inflamatórias, também está presente no processo de formação de ROS na cartilagem (Rosa et al., 2008). O NO, que é altamente reativo com o O_2-, formando o peroxidonitrito (OONO-), este altamente oxidante, contribui para a oxidação de lipídios, depleção do grupo sulfidrila (SH), quebra da fita de DNA, inibindo também a viabilidade do citocromo C na mitocôndria, interferindo com isto, na redução da eficiência da CTE, favorecendo uma maior formação de ERO (Hanafy et al., 2001; Kelly et al., 2014).

No que refere-se ao sistema antioxidante enzimático de defesa constituído pela glutationa reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), NADPH ubiquinona oxiredutase e não enzimáticos como Ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tacoferol (vitamina E) e carotinóide, entre outros que atuam modulando o perfil oxiredutor celular (Soran et al., 2008; Gibson et al., 2009). Quando o sistema está desequilibrado, seja pela produção excessiva de oxidantes (ERO) ou pela redução das defesas antioxidantes, ocorre o evento designado estresse oxidativo. De fato, estudos têm demostrado que existe uma relação direta entre o processo de progressão da OA em pacientes e o aumento de produção de ERO (Henrotin et al., 2005; Altindag et al., 2007; Li et al., 2012; Altay et al., 2015).

Outros estudos evidenciaram que o processo de degradação da cartilagem em pacientes com OA foi associada à presença de produtos da oxidação de lipídios. Foram encontradas, também, menores concentrações de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GSH, demonstrando o papel do estresse oxidativo na patologia (Tiku et al., 1990; Fattman et al., 2003; Gibson et al.,2009; Ertürk et al., 2012).

Sinais emitidos por fragmentos articulares, devido ao estresse mecânico, podem funcionar, segundo alguns estudos, como sinais bioquímicos, que contribuem para o processo de formação excessivo de ERO e inflamação sinovial (Gomez e Thurston, 1993; Sellam e Berenbaum, 2010; Paździor et al., 2019). De fato, o excesso de produção de ERO e NO foi associado por autores à apoptose de condrócitos sadios - *in vitro*, e a condrócitos *in vivo* com OA (Moulton et al., 1997; Beecher et al., 2007). Esses achados reforçam que acorre uma maior formação de ERO na cartilagem com OA, o que auxilia na melhor compreensão do processo fisiopatológico da doença. Na figura 02 fica demonstrado dois dos principais sítios de formação de ERO nos condrócitos articulares no processo da OA.

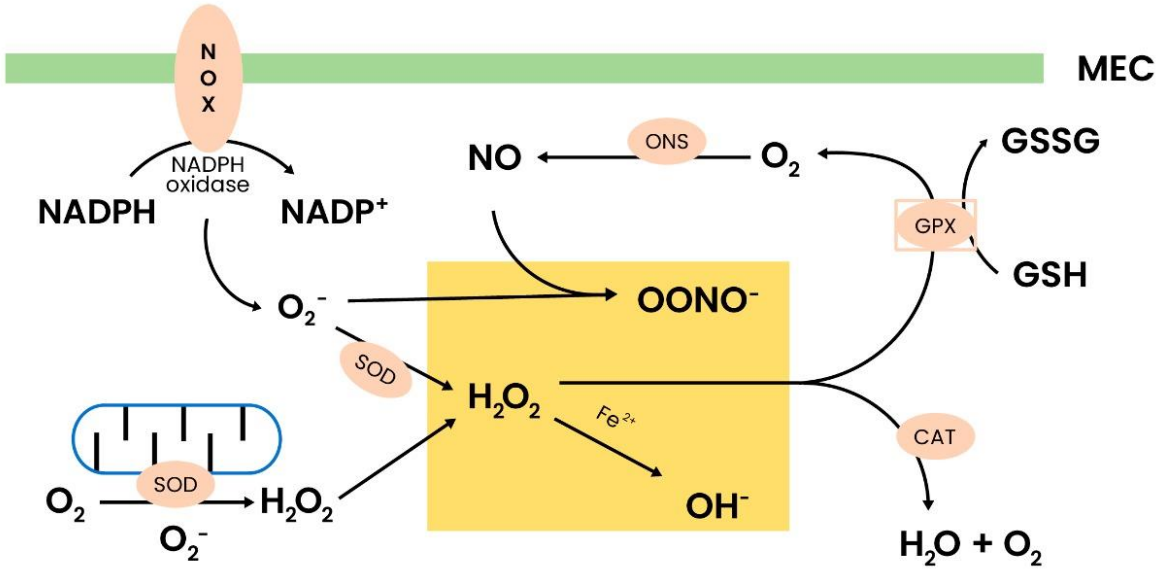

Figura 2 - A figura apresenta a formação de ERO nos principais sítios de formação dentro dos condrócitos articulares: mitocôndrias e o processo de fagocitose (Adaptado de Zahan et al., 2020)

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO COMO TERAPIA NA OSTEOARTRITE

O exercício físico (EF) regular é um aliado terapêutico comprovadamente importante no tratamento de várias doenças crônicas, como as cardiovasculares, diabetes e obesidade. O EF desempenha papel anti-inflamatório e antioxidante, que quando utilizado dentro de parâmetros fisiológicos de frequência, volume e intensidade, proporciona uma série de benefícios nos tecidos (Radák et al., 1999; Petersen e Pedersen, 2005; Cifuentes et al., 2010; Rios et al., 2018**;** Green et al., 2018). No entanto, exercícios físicos realizados em altas intensidades podem promover um cenário pró-inflamatório, acarretando uma produção excessiva de ERO (Pinho et al., 2010; Dantas de Lucas et al., 2014).

Na obesidade, por exemplo, existe uma produção maior de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-18 e TNF-α, em relação as anti-inflamatórias, IL4 e IL-10, e fatores de crescimento, TGF-β, levando a um estado inflamatório persistente de baixo grau, mecanismo similar ao encontrado na OA. Esse processo é mantido pela constante migração de macrófagos do sistema imunológico, que sustentam o estado inflamatório desse tecido adiposo (Yudkin, 2007; Gleeson et al., 2011). No entanto, estudos mostram que o EF de moderada intensidade contribui para diminuição da ativação do sistema imunológico, minimizando assim, o ganho de massa gorda e o risco de desenvolver diabetes (Wedell-Neergaard et al., 2019).

Os benefícios do EF como tratamento da OA, contudo, têm sido alvo de diversos estudos e sua eficácia tem sido discutida com cautela. Evidências na literatura demostram que ele pode auxiliar no processo de recuperação do processo patológico que ocorre da OA, desde que a execução seja dentro de parâmetros fisiológicos, podendo ocasionar na inobservância destes, estresse mecânico excessivo, alterações estruturais nas articulações, processo inflamatório mal resolvido e surgimento de estresse oxidativo, fatores que podem contribuir para o progresso e não para a resolução da OA (Sellam e Berenbau, 2010; Musumeci, 2016; Rios et al., 2018).

A compressão dinâmica moderada proporcionada pelo EF de intensidade moderada pode, segundo a literatura, ser um dos fatores que atuarão na modulação da síntese de colágeno tipo II e proteoglicanos. Além de poder propiciar também alterações em citocinas pró e anti-inflamatórias e a diminuição da apoptose de condrócitos articulares (Quinn et al., 1998; Fehrenbacher et al., 2003; Li et al., 2013).

Um estudo desenvolvido por Li et al. (2013), em cultura de células de cartilagem bovina *in vitro,* demostrou que compressões na articulação com cargas percentuais que oscilaram de leves a moderados (10%, 20% e 30%) sobre a articulação, proporcionaram efeito anticatabólico, atuando sobre o TNF-α e o receptor de IL-6.

Outro estudo que utilizou a infiltração direta de iodoacetato monossódico (MIA) na articulação, como forma de indução da OA, encontrou menor apoptose de condrócitos e diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Os animais que foram submetidos a protocolos de intensidade moderada em esteira, quando comparados aos que não foram exercitados apresentaram menor apoptose e maior número de condrócitos nas avaliações histológicas (Martins et al., 2019).

Em outro trabalho, com indução da OA por MIA, foi observada a diminuição do estresse oxidativo e a preservação de parâmetros histológicos na cartilagem articular de

ratos expostos a um protocolo de leve até moderada intensidade em esteira (Cifuentes et al., 2010).

O colégio americano de reumatologia, em suas diretrizes para o tratamento da OA de 2019, recomenda fortemente, como terapêutica para a OA, o uso de exercícios físicos. O consenso é enfático, porém, ao afirmar que as evidências atuais não são unânimes, principalmente sobre qual tipo exercício deve ser recomendado para pacientes com OA (Kolasinski et al., 2020).

A individualidade biológica, recursos financeiros e tempo disponível para prática terapêutica, são alguns fatores práticos que o consenso elencou como fatores que auxiliam na tomada de decisão sobre qual exercício utilizar, porém, estes são apenas alguns norteadores (Kolasinski et al., 2020). Exercícios aquáticos e em esteiras rolantes são considerados os exercícios físicos isotônicos mais utilizados na pesquisa de base e no processo de reabilitação terapêutica em humanos. Esses exercícios dinâmicos promovem a quebra de homeostase, dentro de padrões fisiológicos, melhorando assim, a amplitude/flexibilidade articular (Cifuentes et al., 2010; Cechella et al.,2014)

A utilização de exercícios na água produz baixo impacto articular, podendo diminuir a sensação de dor, rigidez do sistema musculoesquelético e causar relaxamento muscular em pessoas com OA. A flutuabilidade e a temperatura podem contribuir também para melhorar a qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença (Silva et al., 2008; Dannaway et al., 2017).

Em uma revisão sistemática que analisou dados de mais de mil pessoas, foram demonstrados resultados em que o exercício aquático melhorou a percepção de dor, qualidade de vida e incapacidade em pessoas com OA de joelho. Os estudos tiveram duração média de doze semanas (Bartels et al., 2016). Já exercícios em esteira rolante são da mesma forma muito utilizados, tanto na pesquisa de base com em animais (Rios et al., 2018), como no tratamento da OA em humanos. A maioria dos artigos de grande impacto dentro da literatura utilizam a esteira rolante como forma de prescrição de exercícios, tal fato pode se dar pela especificidade do movimento de marcha humano.

Neste estudo foi utilizado um modelo mecânico de indução de OA nos animais, com a retirada cirúrgica do ligamento colateral mediano (LCM) e do menisco mediano (MM), que mimetiza os danos causados de OA em humanos, buscando compreender melhor se o exercício físico realmente contribui como tratamento para minimizar os efeitos negativos observados na história natural da OA. Para isto, foram utilizados protocolos no solo e na água, avaliando qual destes protocolos proporciona melhor reparo tecidual nos joelhos dos

animais que foram submetidos a um protocolo mecânico de indução da OA. Dessa forma, a revisão de literatura realizada proporcionou fontes para que levantássemos as hipóteses do estudo, além de proporcionar uma melhor compreensão dos aspectos fisiopatológicos da doença. Analisando todas estas variáveis, da fisiopatologia da OA, é possível descrever alguns fatores que estão diretamente ligados a manifestação da OA. Alguns destes mecanismos estão graficamente expostos na figura 03.

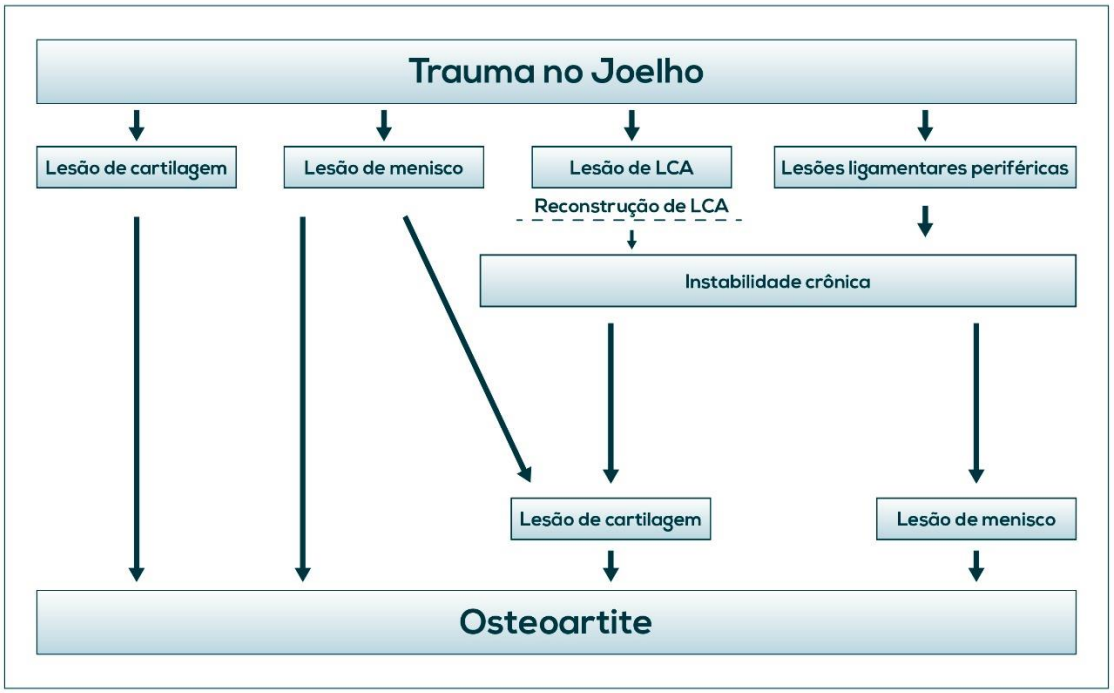

Figura 3 - A figura apresenta um resumo de alguns mecanismos envolvidos na fisiopatologia da osteoartrite (Adaptado de Petersen et al., 2022)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e histológicos do tratamento com exercício físico de moderada intensidade, na água e no solo, em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade de enzima do ciclo de Krebs - Succinato desidrogenase (SDH) e de enzimas da cadeia respiratória (complexos I e II), do músculo estriado esquelético (gastrocnêmio) em um modelo de exercício físico de moderada intensidade, no solo e na água, em ratos submetidos a um modelo mecânico de OA;
- Analisar a produção de oxidantes, danos oxidativos e sistema de defesa antioxidante, do homogeneizado articular, em um modelo de exercício físico de moderada intensidade, no solo e na água, em ratos submetidos a um modelo mecânico de OA;
- Analisar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFNγ, TNF-α, IL1-β e IL-6) e anti-inflamatórias (IL4 e IL-10), do homogeneizado articular, em um modelo de exercício físico de moderada intensidade, no solo e na água, em ratos submetidos a um modelo mecânico de OA;
- Analisar os níveis do (TGF- β) envolvidos no reparo articular, do homogeneizado articular, em um modelo de exercício físico de moderada intensidade, no solo e na água, em ratos submetidos a um modelo mecânico de OA;
- Analisar a histopatologia da quantificação de condrócitos, espessura da cartilagem espessura da superfície de contato, do homogeneizado articular, após exercício físico de moderada intensidade, no solo e na água, em ratos submetidos a um modelo mecânico de OA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido para a Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, para avaliação e foi aprovado no dia 11 de agosto de 2020 sob o número 051/2020 (Anexo 1) tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

3.2 ANIMAIS

Para atender a demanda das análises bioquímicas, moleculares e histológicas, foram utilizados 48 ratos Wistar (2 meses pesando entre 200 – 300g), provindos da colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, EUA) e com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Foram mantidos sob temperatura ambiente controlada entre 20 ± 22ºC, ciclo claro-escuro 12/12h com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*. Os animas foram distribuídos em quatro grupos experimentais, com “n” de doze animais por grupo, sendo que quatro animais foram destinados para análises histológicas, enquanto os demais (oito) destinados às análises bioquímicas e moleculares, da seguinte forma:

G1 - Sham (S);
G2 - Osteoartrite (OA);
G3 - Osteoartrite + Exercício em Solo (OA + ES);
G4 - Osteoartrite + Exercício em Água (OA + EA).

3.3 MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE

O modelo mecânico de osteoartrite foi baseado na ressecção do menisco medial. Os animais foram anestesiados com isuflurano 4%. O joelho direito foi raspado e preparado assepticamente com álcool 90% para exposição cirúrgica. Nos grupos OA, OA+ES e

OA+EA foi realizado a mesma abordagem cirúrgica, baseada na incisão padrão executada nos procedimentos de artroplastia, colocação de próteses, no tratamento de osteoartrite severa em humanos. Trata-se de uma abordagem cirúrgica anterior do joelho, seguida de artrotomia parapatelar medial e luxação lateral da patela, permitindo acesso ao compartimento medial do joelho dos animais. Posterior, as incisões cirúrgicas foram fechadas utilizando fio monofilamentar de nylon em duas camadas (Insall,1971).

Todas as abordagens cirúrgicas nos animais foram realizadas no membro traseiro direito, seguindo o modelo acima descrito. O grupo Sham foi realizado somente a abordagem cirúrgica, sem a meniscectomia, seguida de fechamento da incisão em dois planos. A meniscectomia do menisco medial foi realizada após a abordagem anterior, seguida da artrotomia e da luxação patelar. A ressecção completa do menisco medial do membro posterior direito foi realizada com lâmina de bisturi (frio) sem ressecção adicional do ligamento colateral medial, que foi preservado (Bagi, et al.,2015). Não houve acesso ao compartimento lateral da articulação, assim como não houve ressecção adicional de ligamentos em nenhum dos procedimentos. Sendo preservado os ligamentos centrais do joelho (cruzado anterior e posterior) e os ligamentos colaterais (lateral e medial). A figura 04 mostra o menisco retirado do animal para indução mecânica do modelo de OA.

Figura 4 – A imagem apresenta um menisco retirado da articulação da pata direita traseira do animal, para indução do modelo mecânico de OA (Próprio autor, 2022)

3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO NO SOLO

Os animais do grupo OA+ES foram submetidos à prescrição de exercício físico em solo, conforme protocolo adaptado de (Cifuentes et al., 2010). Na tabela 01 fica demosntrado que inicialmente, que os animais passaram por uma semana de adaptação, semana 0, em dias intercalados da semana, por 10 minutos de treinamento, com velocidade de 10 metros/min, recebendo eletroestimulação (0,2mA) para instruir o animal e estimulá-

lo ao movimento na esteira (Castrogiovanni et al., 2019). Posterior a adaptação, nas semanas 01 e 02, a velocidade da esteira foi de 13 metros/min com tempo de execução de 30 minutos. Nas semanas 03, 04, 05 e 06 foi utilizado velocidade de 16 metros/min sendo o tempo de execução de 30 minutos na semana 03 e 50 minutos nas semanas 04, 05 e 06. Desde a semana de adaptação até a semana 06 os treinamentos ocorreram em dias intercalados. As intensidades e volumes de treinamento correspondem a intensidades leves moderadas, correspondentes a aproximadamente 50% e 60% do VO2 máx conforme descrito por (Leandro et al., 2007; Cifuentes et al., 2010). A figura 05 apresenta a esteira elétrica utilizada para o EF nos grupos EF solo. Na parte inferiro da figura 05 é possível ver as grades de eletroestimulação que foram utilizadas na semana de adaptação.

Tabela 1: Protocolo exercício no solo

Frequência	Velocidade (m/min)	Inclinação (%)	Duração (min)
Adaptação	10	1	10
Semana 01	13	1	30
Semana 02	13	1	30
Semana 03	16	1	30
Semana 04	16	1	50
Semana 05	16	1	50
Semana 06	16	1	50

(Adaptado de Cifuentes et al., 2010)

Figura 5 – A imagem apresenta os animais realizando EF no solo (Próprio autor, 2022)

3.5 PROTOCOLO EXERCÍCIO FÍSICO NA ÁGUA

Os animais do grupo OA+EA foram submetidos à prescrição de exercício físico na água, em um tanque específico para natação projetado para este tipo de estudo, com água

na temperatura de 32 °C, como descrito na tabela 02. O protocolo utilizado foi adaptado de Cechella et al. (2014) e Hsieh et al. (2018) com duração de 20 minutos diários, sendo realizado em sessões intercaladas durante os dias das semanas. Os animais passaram por um período de adaptação de 20 minutos por dia na primeira semana, semana 0. Posteriormente, iniciou-se o programa de natação durante 06 semanas. No início de cada semana de treinamento os animais foram pesados e uma sobrecarga (chumbos de metal, de forma adaptada dentro de um tubo de ensaio, acoplados na cauda do animal) foi adicionada, da seguinte forma: Nas semanas 01,02 e 03 uma sobrecarga equivalente à 3% do peso corporal de cada animal foi adicionado. Nas semanas 04, 05 e 06 uma sobrecarga de 5% do peso corporal foi colocada em cada animal. Para isso cada roedor foi pesado para acompanhamento semanal. A figura 06 mostra os animais realizando o protocolo de natação e como foi anexada no animal a sobrecarga de intensidade.

Tabela 2: Protocolo exercício na água

Frequência	Tempo (min)	Sobrecarga (%)
Adaptação	20	0
Semana 01	20	3
Semana 02	20	3
Semana 03	20	3
Semana 04	20	5
Semana 05	20	5
Semana 06	20	5

Figura 6 - A imagem apresenta os animais realizando EF na água (Próprio autor, 2022)

Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada entre 20 ±22 ^{o}C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água ad libitum.

Na figura 07 está representada a linha do tempo do experimento, onde é possível visualizar como foram realizados todos procedimentos experimentais do estudo.

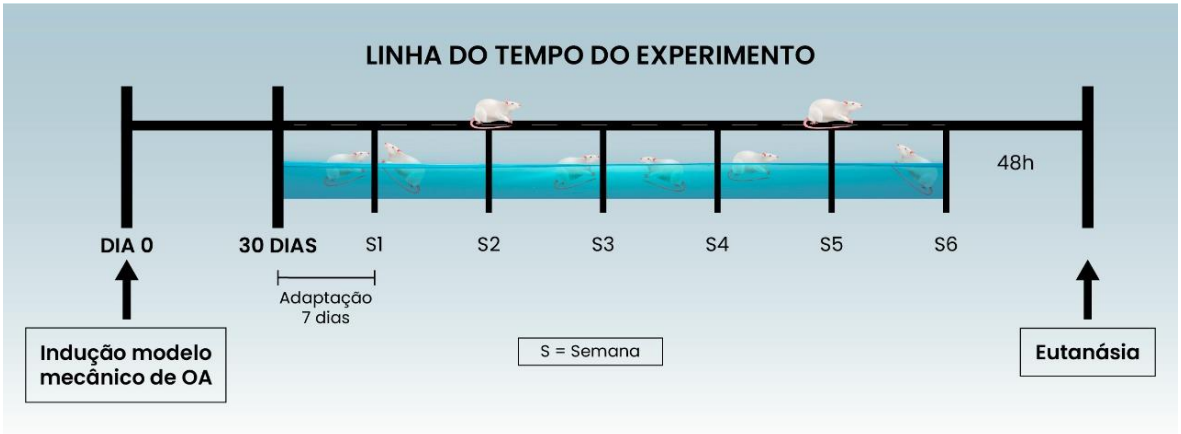

Figura 7 – A imagem representa todos os procedimentos realizados ao longo dos protocolos de EF na água e no solo (Próprio autor, 2022)

3.6 EUTANÁSIA

Após esses procedimentos, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e mortos por decapitação em guilhotina 48h após a última sessão de treinamento, com retirada das amostras de músculo gastrocnêmio para avaliação do metabolismo energético. e de tecido articular para realização das análises bioquímicas e histológicas.

A escolha do músculo estriado esquelético se dá em função das modificações metabólicas que ocorrem nesse tecido quando realizado o EF. O mesmo não ocorre com tanta intensidade no tecido articular, em função de seu caráter avascular.

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.7.1 Metabolismo Energético

3.7.1.1 Atividade da Succinato desidrogenase – Ciclo de Krebs

A atividade da enzima succinato desidrogenase foi determinada de acordo com o método descrito por Fischer e colaboradores (Fischer, 1985). A um meio de incubação foi adicionado tampão fosfato de potássio 62,4 mM pH 7,4, succinato de sódio 250 mM e 2,6-

dicloroindofenol (2,6-DCIP) e amostra. Os sistemas foram pré-incubados por 20 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foi adicionado azida sódica 100 mM, rotenona 1 mM, 2,6-DCIP e metassulfato de fenazina. A redução do 2,6-DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos em espectrofotômetro.

3.7.1.2 Atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassiana et al. (1996), pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto. Em meio de reação foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM, ferricianeto 10 mM, NADH 14 mM, rotenona 2 mM e amostra. Após a adição de todos os reagentes e da amostra, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de 1 em 1 min, durante 3 min, em 420 nm.

A atividade do complexo II foi mensurada pelo método descrito por (Fischer, 1985), pela diminuição da absorbância do 2,6-DCIP. A amostra foi adicionada a um meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM, succinato de sódio 250 mM e 2,6-DCIP 0,5 mM. Foi realizada incubação por 20 minutos a 30oC em banho-maria. Após a incubação foi adicionada azida sódica 100 60 mM, rotenona 2 mM e novamente 2,6-DCIP 0,5 mM, para então ser realizada leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 5 min, em 600 nm.

3.7.2 Estresse oxidativo

3.7.2.1 Oxidantes

DCF é uma técnica bastante empregada como meio de detecção da produção de radicais livres totais. A oxidação da Diclorodihidrofluoresceína Diacetato 2, 7’ (DCFHDA) pelas células causa a fluorescência da diclorofluoresceína que pode facilmente ser lida em espectrofotômetro. Neste ensaio, 180 µL de Tampão Fosfato de Sódio (PBS) e 10 µL de DCFH-DA foram adicionados a 10 µL de homogeneizado de amostra seguidos de 30 minutos de incubação. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde utilizou-se como padrão o DCF-DA 0,1 µM diluído em água destilada em diferentes concentrações. Tanto as amostras quanto a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos 30 minutos foram feitas as leituras no espectrofotômetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas (Wang e James 1999).

Avaliou-se a produção de NO espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO2). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

3.7.2.2 Marcadores de danos oxidativos

3.7.2.2.1 Conteúdo de Sulfidrílas

O conteúdo de proteínas oxidadas foi determinado a partir do conteúdo total de tióis na presença de DTNB (reagente de Ellman ou ácido 5,5′-dithiobis-2-nitrobenzoico) e lido espectrofotometricamente a 412 nm (Aksenov e Markesbery, 2000).

A oxidação de proteínas foi também determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M-1. cm-1.

3.7.2.3 Defesas antioxidantes

3.7.2.3.1 Super óxido dismutase (SOD)

Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina em meio básico adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras da articulação, foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 µL foram retiradas da mesma, a qual 5 µL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 185-180-175 µL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 µl adrenalina (60mM em água destilada +15 µl/ml de ácido clorídrico fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180 segundos em intervalos de 10 segundos e medidas espectofotometricamente a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

3.7.2.3.2 Glutationa (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurada na articulação do joelho após deionização de 30 µL de amostras em 60 µL ácido fosfórico 5% e 30 µL de água destilada. Com a amostra já deionizada foi adicionado 950 µL com 50 µL da amostra e 50 µL do reagente de cor Oftaldeído. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 minutos. Uma curva padrão de glutationa reduzida será usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.7.2.4 Determinação do conteúdo proteico

O teor de proteína a partir do tecido homogeneizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). O reagente Folin fenol foi adicionado para ligar-se à proteína e lentamente reduzido passando de amarelo para azul. A absorbância foi lida a 750nm.

3.7.3 Marcadores inflamatórios

3.7.3.1 ELISA

Para dosagem das citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL1β, IL6, IL4, IL10 e TGF-β) utilizou-se o método enzyme-linked immuno absorbent assay (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA), utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas. Primeiramente as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de proteases, com o intuito de preservar o conteúdo proteico da amostra de interesse. Com as amostras devidamente preparadas, as placas de ELISA são sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando overnight a 4 ºC. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, afim de remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, adiciona-se o anticorpo de detecção, o qual se liga aos antígenos da amostra formando assim uma espécie de “sanduíche” de anticorpo e amostra. Após período de incubação à temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem,

foi adicionado 100 microlitros de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adiciona-se um substrato cromogênico, o Tetrametilbenzidina (TMB), a qual em presença da HRP emiti uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utiliza-se 50 microlitros por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram acondicionadas por uma semana em solução de formaldeído 10% tamponado (tampão fosfato pH 7,4). Em seguida, descalcificadas com ácido fórmico 50%, desidratadas em banhos crescentes de álcool e incluídas em parafina. Secções de 4,0 µm foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (HE) para quantificação do número de condrócitos em lacunas, espessura da superfície de contato da cartilagem e espessura total da cartilage (Filho et al., 2021). Posteriormente foram fotografadas no microscópio óptico LEICA® DM-2000 com câmera LEICA® DFC-300 FX ligado ao computador com o software LAS® - Leica Application Suite (version 3.3.0) para captura das imagens, com aumento de 40X, padronizando-se objetiva, intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador.

Para contagem do número de condrócitos foi utilizado o Plugin “Cell Counter” do software ImageJ. Para quantificação do grau de dano da cartilagem foi utilizado a ferramenta “Perimeter”, quantificando a espessura apenas da superfície de contato cartilagem e espessura total da cartilagem.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio, e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $P<0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

A Figura 8 mostra os níveis de componentes da CTE- Succinato desidrogenase (SDH) e complexos I e II. Na figura A é possível observar uma elevação significativa de SDH nos grupos OA + ES e OA + EA em comparação ao grupo Sham ($p< 0,05$). Também é possível observar diferença estatística dos dois, OA + ES e OA + EA em relação ao grupo OA ($p< 0,01$). Já na figura B é possível observar uma elevação significativa da atividade do complexo I no grupo OA + ES em comparação ao grupo Sham ($p< 0,05$) e em relação ao grupo OA ($p< 0,001$). Em C é possível observar uma elevação significativa da atividade do complexo II no grupo OA + ES em comparação ao grupo Sham ($p< 0,05$) e em relação ao grupo OA ($p< 0,01$).

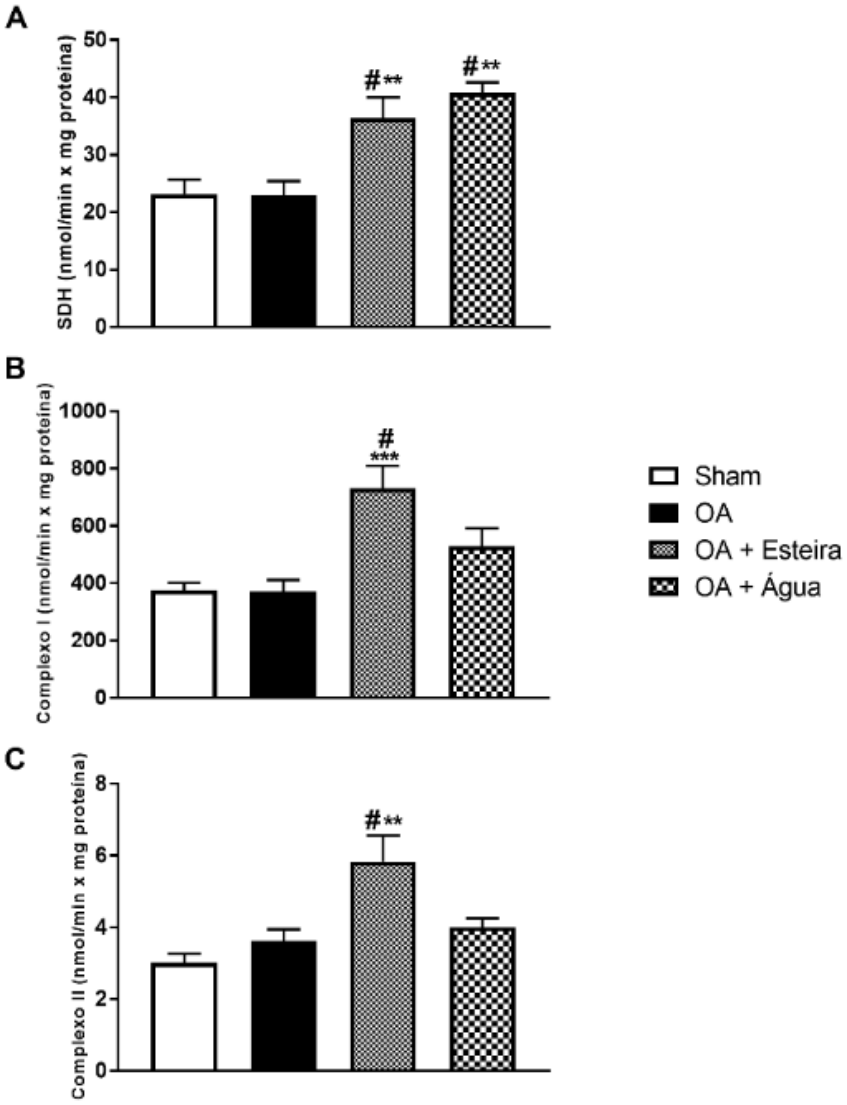

Figura 8 - Atividade dos componentes da cadeia respiratória. Abreviações: OA, osteoatrite; SDH, succinato desidrogenase. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: #p<0,05 v.s Grupo Sham; **p<0,01 v.s Grupo OA; ***p<0,001 v.s Grupo OA; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

4.2 NÍVEIS DE OXIDANTES

Na figura 9 é possível observar uma elevação significativa de DCF no grupo OA, OA + ES e OA + EA em relação ao grupo Sham (p< 0,05), enquanto o grupo OA + ES apresentou redução significativa quando comparado ao grupo OA (p<0,05). Já os níveis de nitrito apresentaram aumentos significativos nos grupos OA e OA + EA quando comparados ao Sham (p<0,05), enquanto o grupo OA + ES apresentou redução significativa redução das concentrações de nitrito quando comparado ao grupo OA (p<0,001).

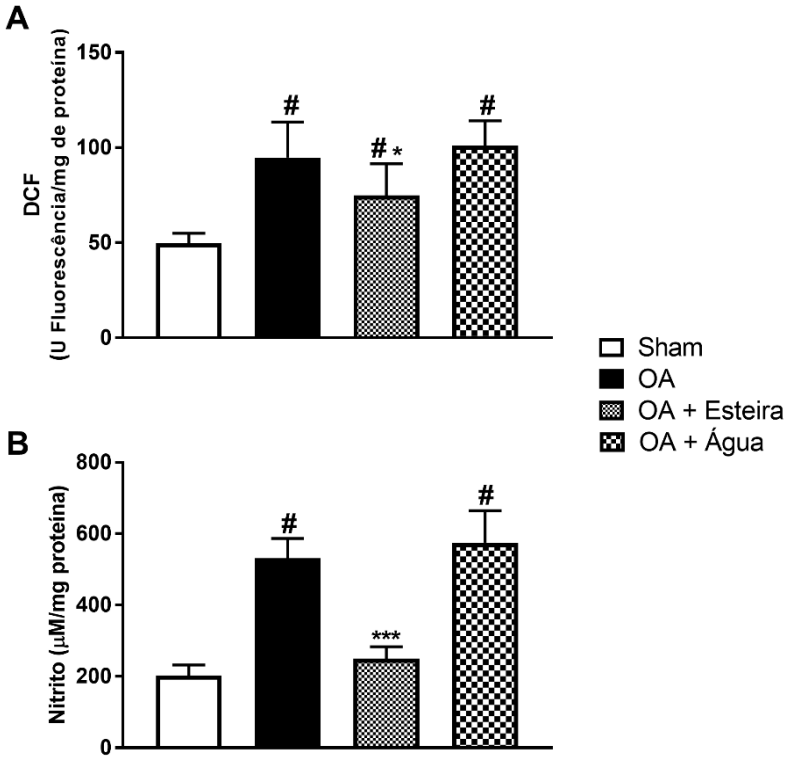

Figura 9 - Oxidantes. Abreviações: DCF, diclorofluoresceína; OA, osteoatrite. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: #p<0,05 v.s Grupo Sham; *p<0,05 v.s Grupo OA; ***p<0,001 v.s Grupo OA; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

4.3 NÍVEIS DE DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Para avaliar o dano oxidativo, foram analisados os níveis de carbonil e o teor de sulfidrilas (Figura 10). Em A é possível observar uma elevação significativa de carbonil no grupo OA, OA + ES e OA + EA em relação ao grupo Sham (p<0,05). Em B é possível observar uma redução significativa de sulfidrila no grupo OA, OA + ES e OA + EA em relação ao grupo Sham (p<0,05), enquanto o grupo OA + ES apresentou elevação significativa quando comparado ao grupo OA (p<0,05).

Para avaliar a atividade do sistema antioxidante, a atividade da SOD e os níveis de GSH foram medidos (Figuras 10 C - D). Na figura 11 C é possível observar uma redução significativa de SOD no grupo OA (p<0,05), em relação ao grupo Sham, enquanto nos grupos OA + ES e OA + EA apresentaram elevações significativas de SOD quando comparados ao grupo OA (p<0,0001). Em D é possível observar uma redução significativa de GSH no grupo OA (p<0,05). Já o grupo OA + ES apresentou aumento significativo (p<0,01) quando comparado ao grupo OA. Já o grupo OA + EA também apresentou elevações significativas de GSH quando comparados ao grupo OA (p<0,05).

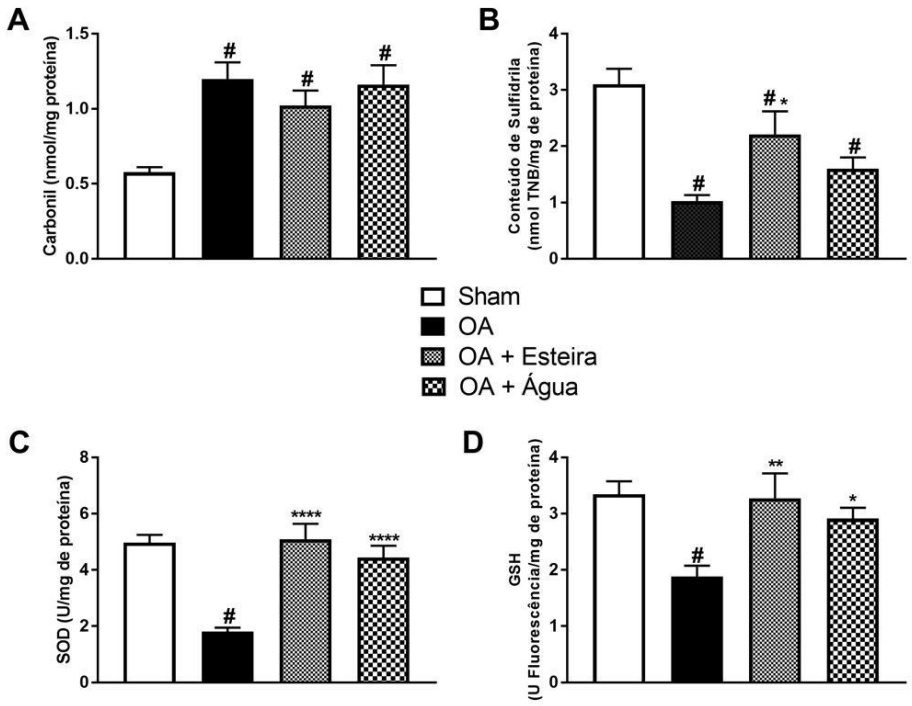

Figura 10 – Níveis de dano oxidativo e sistema anti-oxidante. Abreviações: GSH, glutationa reduzida; SOD, superóxido dismutase. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: #p<0,05 v.s Grupo Sham; *p<0,05 v.s Grupo OA; **p<0,01 v.s Grupo OA; ****p<0,0001 v.s Grupo OA; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

4.4 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

A Figura 12A-D mostra os níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, TNF-α, IL1β e IL6.

Observa-se em A que os grupos OA e OA + EA apresentaram aumentos significativos de IFN-γ em relação ao grupo Sham, enquanto o grupo OA + ES apresentou diminuição significativa em relação ao grupo OA (p<0,05). Na figura B é possível observar um aumento significativo de IL1β no grupo OA em relação ao grupo Sham (p<0,05), enquanto o grupo OA + ES e OA + EA apresentaram reduções significativas nos níveis de IL1β quando comparado ao grupo OA (p<0,0001 e p<0,001), respectivamente. Já em C fica demostrado que o TNF-α apresentou aumento significativo no grupo OA em relação ao grupo Sham (p<0,05), enquanto o grupo OA + ES e OA + EA apresentaram reduções significativas neste marcador quando comparado ao grupo OA (p<0,001). Em D observamos aumento significativo de IL6 no grupo OA e OA + EA em relação ao grupo Sham (p<0,05). Também foi observada diminuição da concentração de IL6 nos dois tipos de exercício físico quando comparado ao grupo OA. O grupo OA + EA apresentou (p<0,01), enquanto o grupo OA + ES apresentou (p<0,001).

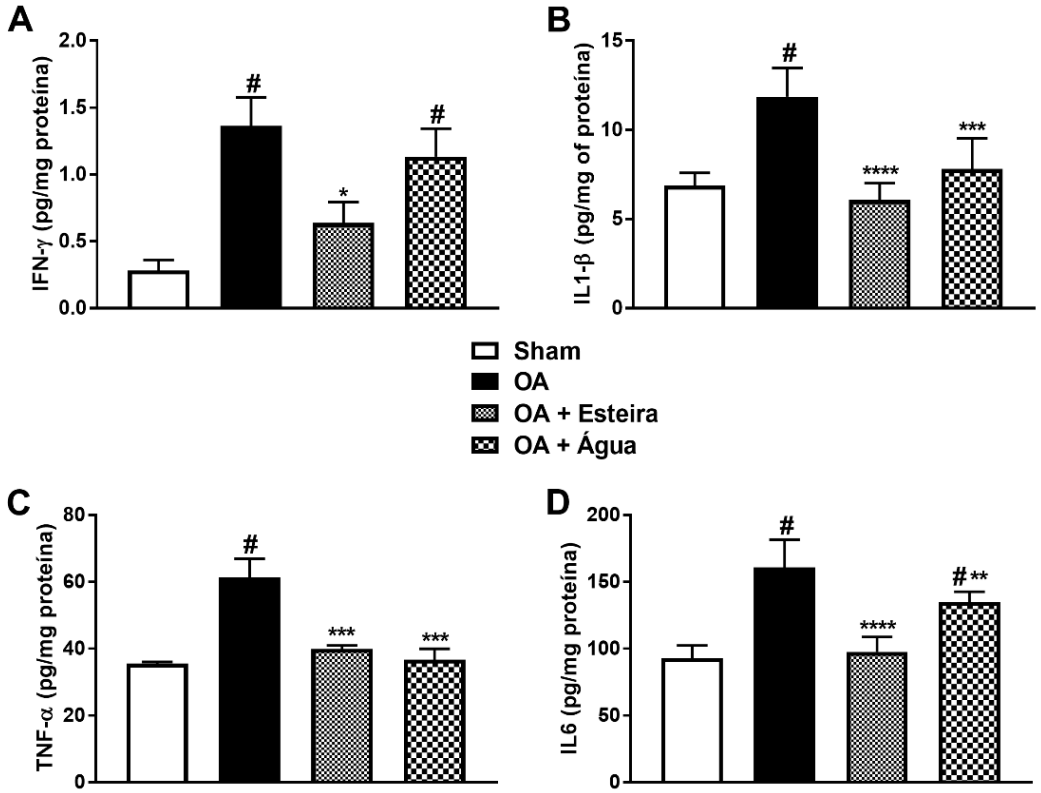

Figura 11 - Citocinas pró- inflamatórias. Abreviações: IL, interleucina; INF, interferon; OA, osteoatrite; TNF, fator de necrose tumoral. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: #p<0,05 v.s Grupo Sham; *p<0,05 v.s Grupo OA; **p<0,01 v.s Grupo OA; ***p<0,001 v.s Grupo OA; ****p<0,0001 v.s Grupo OA; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

4.5 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS

A Figura 13A-D mostra os níveis de citocinas anti-inflamatórias IL4, IL10 e fator de crescimento TGF-β.

Na figura A é possível observar uma diminuição significativa de IL4 no grupo OA e OA + EA em relação ao grupo Sham (p<0,05), enquanto o grupo OA + ES apresentou aumento significativo dos níveis de IL4 quando comparado ao grupo Sham (p<0,05) e elevação significativa da concentração de quando comparado ao grupo OA (p<0,0001). Já na figura B observamos uma diminuição significativa de IL10 no grupo OA (p<0,05) comparado ao grupo Sham e elevação da concentração desta proteína no grupo OA + ES também em relação ao grupo Sham (p<0,05). Observamos aumento significativo de IL10 nos grupos OA+ES e OA e EA quando comparado ao grupo OA (p<0,0001 e (p< 0,05), respectivamente. Já na figura C é possível observar uma diminuição significativa de TGF-β no grupo OA em relação ao grupo Sham (p<0,05). Enquanto o grupo OA + ES apresentou aumento significativo dos níveis de TGF-β quando comparado ao grupo Sham (p<0,05) e aumento significativo quando comparado ao grupo OA(p<0,0001) .

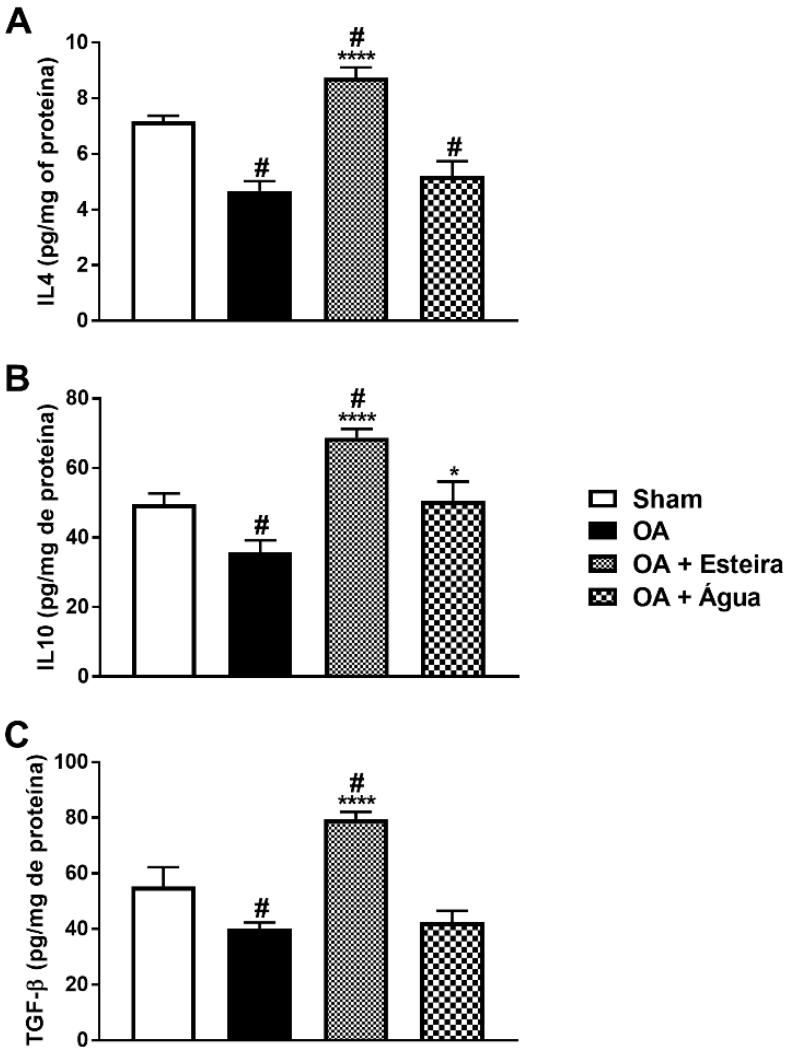

Figura 12: Citocinas anti-inflamatórias. Abreviações: IL, interleucina; OA, osteoatrite; TGF, fator de transformação do crescimento. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: #p<0,05 v.s Grupo Sham; *p<0,05 v.s Grupo OA; ****p<0,0001 v.s Grupo OA; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na Figura 14, em A avaliamos a média do número de condrócitos dentro da lacuna (40µm). Observamos que o grupo OA e OA + EA apresentaram diminuição significativa do número de condrócitos por lacuna quando comparado ao grupo Sham (p<0,05). Já o grupo OA + ES apresentou elevação significativa de condrócitos por lacuna quando comparado ao grupo ao (p< 0,001). Na figura B não foi observada nenhuma alteração significativa entre os grupos quanto à espessura da cartilagem. Em D os grupos OA, OA + ES e OA + EA apresentaram reduções estatisticamente significantes quando comparados ao Sham (p<0,01), com relação a espessura da superfície de contato da cartilagem.

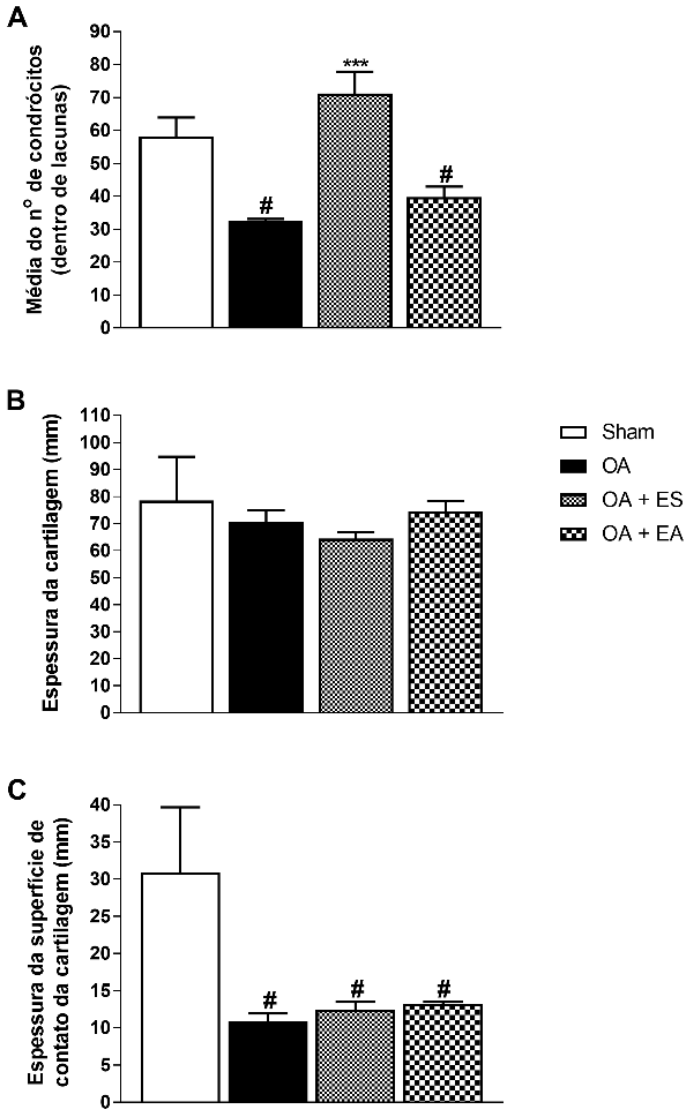

Figura 13 – Análise histológica**.** Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: #p<0,05 v.s Grupo Sham; ***p<0,001 v.s Grupo OA; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Tukey).

5 DISCUSSÃO

A etiopatogenia da OA segue como objeto de muita discussão na literatura, apesar do grande número de estudos que tentam melhor compreender a fisiopatologia da doença. Dado o caráter avascular e a baixa celularidade do tecido articular, dúvidas, principalmente sobre como tratar a OA, seguem sendo alvo de diversas investigações.

Na literatura, dentre os processos que podem gerar o desenvolvimento da OA, um dos mecanismos bem difundidos trata da interação de citocinas produzidas por macrófagos residentes no ambiente articular de tecidos lesados. Macrófagos residentes entram em contato com padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) , estimulando com isso os receptores de sua membrana celular – receptores do tipo toll (TLRs), para iniciar uma cascata de sinalização, que culmina com a transferência do NF-kB para o núcleo celular, onde ocorre transcrição de citocinas pró-inflamatórios (Tromm et al.,2012; Jimi et al., 2004, Woodell-May e Sommerfeld, 2020). Quando o IKK é fosforilado pelos gatilhos inflamatórios da OA o complexo NF-kB e IKB no citosol se desfaz, liberando o NF-kB para se translocar para o núcleo, ativando assim a transcrição de genes alvo, produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF-α e IL-1β (Jimi et al., 2004).

Este processo também mantém um ciclo vicioso de macrófagos (M1) na articulação, promovendo o processo de fase aguda inflamatória. Através da ativação de moléculas de adesão intracelular como a ICAM-1, estimuladas pela presença de citocinas pró-inflamatórias, mantém a afinidade de integrinas pelos leucócitos no local lesado (Kumar et al., 2010; Baker et al., 2011; Hayden e Ghosh, 2008). Subsequentemente, linfócitos TH1 são atraídos para a área articular lesada e, estimulados pelo ambiente pró-inflamatório, secretam IFN-y que são citocinas relacionadas à promoção da diferenciação de monócitos para macrófagos do tipo M1 (via clássica). Por sua vez, esses novos macrófagos ativados afetam o microambiente inflamatório com a liberação de mais proteases, EROs, além de citocinas inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α sustentando a fase pró-inflamatória e aumentando o dano articular (Zahan et al., 2020).

O (EF) é considerado uma alternativa não farmacológica de tratamento da OA com resultados satisfatórios para a redução do quadro álgico, melhora de função e estabilização de progressão da doença (Assis et al., 2016; Tomazoni et al., 2017). Neste sentido este estudo se propôs a investigar qual tipo de EF (EA ou ES), melhor contribui para o reestabelecimento de parâmetros bioquímicos, moleculares e estruturais alterados pela OA. Na literatura ainda existem várias discussões e dúvidas no que se refere a qual EF seria o mais indicado, entre os mais prescritos, se o EA ou ES no tratamento da OA. Nesse

sentido, nosso trabalho teve como proposta comparar os dois tipos e analisar qual deles proporcionou melhores resultados nos animais.

No presente estudo avaliamos os níveis de succinato desidrogenase (SDH), como um marcador metabólico de atividade mitocondrial no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons (CTE), que apresentou níveis elevados de atividade nos dois grupos exercitados em comparação ao controle. Isto evidencia, que ambos os protocolos de EF proporcionaram alterações no padrão aeróbio dos animais, sugerindo que a realização de EF foi capaz de gerar aumento na atividade mitocondrial (Kang et al., 2009; Radak et al., 1999; Tromm et al., 2012). No entanto, maior atividade nos complexos I e II foi observado no ES e EA em comparação ao demais grupos o que possibilita avaliarmos, em tese, que uma maior atividade do metabolismo aeróbio nesse grupo foi observada em comparação ao EF água.

Durante o processo de produção de ATP, 2 a 4% do oxigênio participante do processo de respiração celular na cadeia respiratória mitocondrial é convertido em ERO; consequentemente, espera-se que a realização de atividades que exijam maior demanda energética, como a prática do EF, aumente a produção destes marcadores. Para contrabalançar este aumento de moléculas oxidantes, o EF estimula a produção de enzimas antioxidantes, como observado nos grupos submetidos a exercícios físicos (Clabrese et al., 2005; Keeney et al., 2006; Tromm et al., 2012).

A intensidade de execução do EF é um fator relevante na produção de ERO (Tromm et al., 2012; Zahan et al., 2020; Cifuentes et al., 2010). Intensidades altas, elevam a produção e o acúmulo de ERO em resposta a uma maior necessidade de oxigênio durante sua realização (Carmeli et al., 2000; Hellsten et al., 2007; Pinho et al., 2006; Pinho et al., 2010). Em contrapartida, o EF realizado em intensidade moderada (Cifuentes et al., 2010; Leandro et al., 2007; Tromm et al., 2012; Sutton et al., 2001), pode modular os parâmetros de (EO) tanto pela elevação da atividade de enzimas antioxidantes, como pelo decréscimo na produção de oxidantes, ou ainda pelo menor extravasamento de radicais na CTE, como observamos nos nossos resultados (Filho et al., 2021; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001).

Assim sendo, no presente estudo utilizamos protocolos de exercícios de moderada intensidade praticados no solo e na água, visando avaliar seus efeitos sobre parâmetros moleculares, bioquímicos e estruturais de animais que foram submetidos à indução mecânica da OA (Leandro et al., 2007; Cifuentes et al., 2010; Iijima et al., 2016, Cechella et al., 2014; Hsieh e Yang, 2018; Assis et al., 2016; Tomazoni et al., 2017; Rios et al., 2018; Castrogiovanni et al., 2019), através de modelo já padronizado pelo nosso grupo de

pesquisa, capaz de prover a mimetização dos mecanismos fisiopatológicos próprios da OA (Filho et al., 2021). Os resultados aqui apresentados demonstraram que três sessões semanais, realizadas por um período de sete semanas, foram suficientes para promover alterações nos parâmetros de EO nos dois tipos de EF utilizados, porém, com melhores resultados em animais submetidos ao protocolo no solo (ES) (Pinho et al., 2006; Silva et al., 2009; Aguiar et al., 2008).

Enquanto na água o movimento está associado a uma ação mecânica de empuxo que protege contra sobrecarga na articulação, no solo existe a ação mecânica de impacto que, apesar de ser um dos principais fatores para o próprio desenvolvimento da osteoartrite, quando realizado em intensidades adequadas, pode promover benefícios à articulação como a maior entrega de nutrientes e oxigênio favorecendo a uma melhor homeostase celular (Cechella et al.,2014; Hsieh et al.,2018).

Desta forma, a tensão mecânica promovida pelo exercício físico pode ter efeitos favoráveis ou deletérios com magnitude dependente da intensidade aplicada, além de produzir variações de oxigênio molecular nos condrócitos da cartilagem (Tomazoni et al., 2017; Lammert et al., 2014). Os condrócitos presentes na camada média e principalmente superficial da cartilagem são os mais afetados, possuem maior difusão de nutrientes por meio do líquido sinovial, e em decorrência, também possuem maior disponibilidade de oxigênio que, por sua vez, é utilizado pelas mitocôndrias das células condrocíticas produzindo ERO pelos mecanismos mitocondriais clássicos (Kuhn et al., 2003; Aguiar et al., 2008).

É sugerido que nestas células, o estresse mecânico excessivo e as forças de cisalhamento contínuo dentro da articulação provoquem uma cascata de sinalização que culmine com a transdução de sinais biomecânicos em bioquímicos, provocando aumento de ERO e inflamação nos principais sítios de produção de ERO na articulação, que são os condrócitos (Knocloch et al., 2008; Hunter et al., 2002; Zahan et al., 2020). No entanto, na OA a sinalização ERO e inflamação nos condrócitos dependerá do grau de compressão, da magnitude, frequência e duração destas forças compressivas e de cisalhamento advindas do EF, refletindo proporcionalmente em mudanças estruturais benéficas que serão observadas após as mudanças bioquímicas e moleculares do tecido afetado (Zahan et al., 2020; Kumar et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; Giannoni et al., 2003).

Evidências na literatura indicam que EF gera ERO, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxila e peróxido nitrito podendo causar EO, principalmente pela via mitocondrial e da NADPH oxidase, uma importante enzima envolvida na formação de ERO

no líquido sinovial (Zahan et al., 2020, Radak et al., 1999; Tromm et al., 2012; Cifuentes et al., 2010; Carlo e Loeser, 2003; Silva et al., 2009).

No entanto existem mecanismos próprios de resposta celular a este estresse, induzidos pelo EF, capazes de reestabelecer a homeostase celular (Halliwell, 1994). Um destes mecanismos envolve as adaptações enzimáticas em mitocôndrias que sofreram influência do treinamento físico moderado, que parece colaborar com as adaptações musculares e da CTE (Silva et al.,2009; de Liso et al.,2011; Strobel et al., 2011; Dussin et al., 2008).

Paralelamente a degradação da cartilagem produzirá ERO e inflamação, através da ativação da (iNOS) em resposta à presença de (IL-1β), (TNF-α) e (IFN-γ), produzindo quantidades importantes de (ONOO-), radical altamente oxidante, considerado produto da reação entre O2- e NO (Zahan et al., 2020; Nathan, 1992; Rosa et al., 2008; Del Carlo e Loeser, 2002).

Encontramos níveis elevados de (NO) no grupo OA em comparação ao grupo SHAM e tratados com EF moderado. Conforme é descrito na literatura, animais frequentemente expostos ao treinamento físico produzem quantidades menores de oxidantes como NO e maior atividade das enzimas antioxidantes (Pinho et al.,2006; Silva et al., 2009a; Silva et al., 2009b; Gomez-Cabrera et al., 2008). Desta forma entende-se que os grupos tratados com EF foram capazes de regular a concentração de NO, pelo mecanismo de adequação do sistema enzimático de defesa antioxidante (SOD e GPX) e pela elevação da resistência tecidual aos danos oxidativos que são desenvolvidos pelo EF.

Na presente pesquisa foi também observada redução dos níveis de Diclorofluoresceína (DCF) no grupo ES (Zahan et al., 2020; Cifuentes et al., 2010). Este marcador demonstra principalmente os níveis de peróxido de hidrogênio (H2O2), que dentro dos condrócitos, suspende a síntese de proteoglicanos e altera a síntese de ATP na CTE (Johncson et al., 2000; Migita et al., 2001). A menor síntese de DCF (H2O2) observada no EF no solo, pode ser explicada pela elevação da ação do sistema antioxidante SOD e GPX, proporcionada pelo treinamento imposto aos animais, contribuindo para a manutenção equilibrada do sistema redox (Tromm et al., 2012).

É sabido que o desequilíbrio deste sistema redox pode também modificar proteínas que se tornam susceptíveis a degradações proteolíticas. Alguns aminoácidos são convertidos em produtos derivados de carbonil, considerado parâmetro de avaliação de dano celular oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nos grupos que realizaram EF os níveis de carbonil foram alterados pela ação do treinamento físico. Um possível mecanismo

para esta redução de carbonilação proteica seria o fato de que o EF aumenta a atividade de proteossomas, considerados complexos proteicos diretamente relacionadas ao processo de reparo proteico frente ao EO presente na articulação osteoartritica (Radak et al., 1999; Tromm et al., 2012).

A análise do conteúdo de sulfidrila, outro marcador de dano oxidativo, avalia a quantidade de grupos tióis presentes nos grupos e permite visualizar a quantidade de grupos sulfidrilas (SH) que não foram oxidados e que ainda permanecem ligadas aos aminoácidos. O grupo SH é constantemente atacado pelas ERO, principalmente NO, para atingir a estabilidade eletrônica, comprometendo assim a função das proteínas naquele local. Uma possível explicação seria a maior ativação de enzimas antioxidantes (SOD e GPX) proporcionadas pelo EF moderado nos animais, que auxiliou no maior controle do excessivo processo de oxidação.

Dentre os mecanismos importantes decorrentes do EF capazes de diminuir a ação deletéria das ERO, podem ser citados o aumento na atividade e expressão de agentes antioxidantes como a (SOD) e do sistema (GPX) (Gibson et al., 2009; Fattman e Schaefer, 2003). Alguns estudos mostram que níveis da SOD e da atividade da GPX estão aumentados em animais pós EF, diminuindo níveis de oxidantes nos tecidos, além de proporcionar um menor extravasamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Tromm et al., 2012; Aguar et al., 2008). Corroborando aos resultados apresentados na presente pesquisa, outros trabalhos também demonstraram melhora na função mitocondrial proporcionada pelo EF de moderada intensidade, atenuando a ação das ERO na articulação e promovendo elevação da atividade do sistema antioxidante nos grupos de animais treinados, principalmente em esteira (Packer et al., 2008; Cifuentes et al., 2010).

Além da presença de estresse oxidativo, recentemente tem-se associado a manifestação e progressão da OA a quadros inflamatórios crônicos, capazes de gerar alterações morfológicas na estrutura da articulação e que estão diretamente relacionados ao equilíbrio redox (Woodell-May e Sommerfeld; 2020; Boondeson et al., 2010). Frente a isso, estudos veem demonstrando que o EF de moderada intensidade pode modular a alteração do fenótipo de macrófago ativado (M1 para M2), os tipos de citocinas produzidas pelos macrófagos, o tipo de colágeno produzido na articulação e a diminuição da degradação da MEC. Além disso, o EF também promove menor expressão gênica de (MMPs) e diminuição do processo de apoptose em condrócitos (Quian et al., 2014; Galois et al., 2004).

Desta forma, o presente protocolo de EF, tanto no solo quanto na água, pareceu modular de alguma forma estes sinais inflamatórios associados à degradação nos grupos que realizaram treinamento físico protegendo contra o desgaste da cartilagem articular. Os exercícios de moderado impacto propostos, exerceram ao que parece, forças mecânicas que atuaram como importantes sinalizadores biomecânicos anti-inflamatórios, inibindo a estimulação da (IL-1β), do (TNF-α), da (IL-6) e a apoptose dos condrócitos (Yang et al., 2019).

O grupo que executou exercício em solo mostrou melhores resultados na diminuição destes parâmetros, ao qual estima-se que possa haver relação com as diferenças de características da ação mecânica do movimento gerado no EF nestes dois diferentes protocolos. Enquanto o exercício na água exerce resistência mecânica no movimento, evidenciado pela coluna de água no tanque de natação e pouco impacto, o exercício em solo propiciou resistência mecânica adequada e intensidade de impacto que pareceu modular a sinalização anabólica dentro do ambiente articular (Tromm et al., 2012; Filho et al., 2021; Cifuentes et al., 2010; Leandro et al., 2007).

Embora a literatura evidencie que a sobrecarga e impacto articular possam ser um dos fatores para osteoartrite (Witternauer et al., 2013) destaca-se que o exercício em solo, dentro de proporções adequadas de impacto biomecânico, possa estimular a melhor perfusão de nutrientes entre o líquido sinovial e a cartilagem, dando aporte para a homeostase de condrócitos e sua capacidade de reparação da cartilage (Castrogiovanni et al., 2019; di Rosa et al., 2019).

Ademais, esta sinalização biomecânica/bioquímica promovida pelo EF é considerada capaz de promover um desfecho *“downregulated”* que pode induzir condrócitos a não produzirem proteases, tal como as MMP’s, principalmente a 3 e 13, que estão diretamente ligadas a degradação da MEC articular (Valhmu et al., 1998; Angele et al., 2003; Lu et al., 2021).

Todavia, importante destacar que a literatura descreve que essa regulação é dependente da intensidade e volume do exercício, ou seja, a sinalização biomecânica associada ao EF em alta intensidade pode sobrecarregar os condrócitos, promovendo hipertrofia, senescência ou até mesmo apoptose, resultando perda articular e formação de osteófitos (Woodell-May e Sommerfeld, 2020; Molnar et al., 2021). Contudo, em estudos e revisões sobre o comportamento dos condrócitos e sinoviócitos, foram apresentados feedbacks positivos induzidos por alterações mecânicas em articulações que foram expostas ao EF moderado como tratamento para a OA, como a manutenção por exemplo

nos níveis de TGF-β, importante modulador do processo de manutenção articular (Tromm et al., 2012; Kumar et al., 2010; Castrogiovanni et al., 2019; Park et al., 2004; Long et al., 2001; Fehrenbacher et al.,2003).

Estudos por meio de bioinformática revelaram também que o EF moderado gera menor expressão gênica de caspase-3 e de NF-kB na articulação. Desta forma, nossos achados encontram-se alinhados com tais estudos, isto porque, a caspase-3 está relacionada a apoptose celular de condrócitos (Yang et al., 2019; Qian et al., 2014; Galois et al., 2004; Lu et al., 2021), sendo que no presente estudo pode ser observado uma leve tendência de elevação do número de condrócitos no grupo EF água e aumento estatístico do número de condrócitos no grupo submetido ao EF no solo em comparação ao grupo OA. Além disso a expressão NF-kB está relacionada a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α ao qual foram encontradas em menores quantidades em ambos os grupos treinados.

O grupo tratado com exercício em solo apresentou também menor quantidade de IFN-y. Portanto pode-se presumir que este método foi mais eficiente em controlar a ativação de macrófagos pela via clássica (M1), auxiliando a atenuar suas demais manifestações pró-inflamatórias.

Assim, avaliar a ação destas citocinas (pró e anti-inflamatórias) no tratamento com EF na doença articular, parece ser de fundamental importância para melhorarmos nossos conhecimentos sobre a fisiopatologia da doença. Assim poderemos perceber melhor como elas se comportam na articulação doente durante o tratamento com EF (Shuerwegh et al., 2003).

Na OA, macrófagos M1 e condrócitos presentes na membrana sinovial (MS) osteoartrítica secretam IL-6 no meio articular, assim como, MMPs contribuindo para o processo de degradação da MEC da articulação. Adipócitos hipertróficos também secretam IL-6 ativando esses leucócitos na MS, o que causa uma maior síntese de IL-1β e TNF-α e decorrente desgaste articular. No presente estudo, esta situação pode ter sido também alterada, pela oxidação lipídica imposta pela execução do EF moderado (Kapoor et al., 2011).

Já a IL-6 tem função de induzir a expressão de moléculas quimioatraentes de macrófago (M1) como ICAM-1 no tecido articular. Estudos indicaram que ratos knockout para o gene de IL-6 sinalizam menos, o que acarretaria em tese, em menor fluxo de M1 para o local da lesão (Woondell-May e Sommerfeld, 2020; Romano et al. 1997).

Por outro lado, dado seu caráter pleiotrópico, dependendo do local de produção, a IL-6 pode ter ação diferenciada (Pedersen et al., 1985; Gleeson et al., 2011). Isto porque os músculos estriados esqueléticos em contração durante o EF, produzem IL-6 no miócito com ação anti-inflamatória controlada pela ação do CA_2+ e da proteína quinase ativada por glicogênio (MAPK) (Tromm et al., 2012; Benatti e Pedersen, 2015). Esta IL-6, advinda dos miócitos no EF moderado nos músculos exercitados, induz a produção do receptor antagonista da IL-1β, citocina denominada IL-1ra e da interleucina anti-inflamatória IL-10, contribuindo para minimização do processo inflamatório agudo (Castrogiovanni et al., 2019; Benatt e Pedersen, 2015; Gleeson et al., 2011).

Nossos achados encontraram redução de IL-6 no homogeinizado articular nos grupos tratados com EF, principalmente nos grupos EF executados no solo. A IL-6m com perfil anti-inflamatório que tem seu pico durante a contração muscular em exercício, seguida de uma diminuição gradual importante logo após o fim da atividade (Benatti e Pedersen, 2015; Fisher, 2006). Com isso, como a retirada do material para análise desta citocina foi após 48h da última sessão de exercício, e que foi advinda da articulação e não do músculo, entende-se que a IL-6 avaliada possua um perfil pró-inflamatório provavelmente associado às características da doença osteoartrítica.

Desta forma, este resultado de diminuição da IL-6 em nossos achados pode estar atrelado ao efeito adaptativo crônico após sequenciais sessões agudas de EF em moderada intensidade, contribuindo assim, para a diminuição do ambiente pró-inflamatório observado nos grupos tratados com EF moderado (Fisher, 2006).

Avaliamos, portanto, que a IL-6 em momentos de contração muscular, tenha se comportado como citocina anti-inflamatória. Isso denotou aos nossos grupos tratados com EF, principalmente pela via parácrina, um aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como o receptor antagonista da IL-1β (IL-1ra), IL-10 e a inibição da síntese de TNF-α na articulação (Tromm et al., 2012).

Outra citocina importante para melhor compreensão do processo fisiopatológico da OA é a citocina IL-1ra. Ela se liga ao mesmo receptor de membrana da IL-1β, impedindo-a de se ligar ao seu receptor de membrana e consequentemente detendo o desencadeamento das respostas catabólicas características da IL-1β. Este pode ser um dos mecanismos responsáveis pela diminuição da ação da IL-1β nos grupos tratados com EF moderado. Isto é, a IL-1β estimula os condrócitos a liberarem fatores inflamatórios via NF-kB e MAPK, além de que M1 ativados na membrana sinovial, pela ação de quimiocinas,

são uma importante fonte de IL-1β no ambiente articular (Wang et al., 2016; Ma et al., 2016; Jenei-Lanzl et al., 2019).

Já a IL-10, que é considerada uma citocina anti-inflamatória clássica, está envolvida na diminuição da expressão de MMP's e na diminuição da síntese IL-1β e TNF-α na articulação (Molnar et al., 2021); é sintetizada por diversas células imunes e também por condrócitos, tendo um papel de destaque na manutenção fisiológica da MEC da cartilagem por possuir propriedades condroprotetoras pela estimulação da síntese de colágeno do tipo II. (Wojdasiewicz et al., 2014; Shulze-Tanzil et al., 2009; Mostafa et al., 2001).

Os resultados aqui apresentados indicam que o EF moderado foi capaz de aumentar a concentração da citocina IL-10, atuando como um condroprotetor nos grupos treinados, o que está de acordo com estudos realizados anteriormente (Castrogiovanni et al., 2019). Dados da literatura indicam que a terapia com EF moderado é capaz de modular positivamente a síntese de IL-10, bloqueando assim danos à articulação (Mathiessen e Conaghan, 2017; Fernandes et al., 2002). Outro mecanismo envolvido na produção intra-articular de IL-10 se refere a mudança fenotípica de macrófago M1 para M2, estimulada pelo treinamento físico. Esta mudança de M1 para M2 possibilita a síntese de IL-10, propiciando o surgimento de um ambiente anabólico condroprotetor, desencadeado pela exposição da cartilagem à tensões apropriadas, juntamente com um desfecho positivo de efeitos anti-inflamatórios provenientes da prescrição de EF moderado.

Outra citocina participante do processo anti-inflamatório e avaliada no presente estudo, foi a interleucina-4 (IL4). Sua via de sinalização ainda não é totalmente conhecida, mas especula-se que a produção de IL4 esteja associada às células Th2 que se infiltram na membrana sinovial durante o processo da OA (Ishii et al., 2002). Está descrito que ela desempenhe papel importante na condroproteção articular, inibindo também a secreção de MMPs, acabando assim por minimizar a degradação de proteoglicanos, que são observados no curso natural da OA não tratada (Van Meegeren et al., 2012). Acredita-se que ela possa estar envolvida em mecanismos parecidos com os notados na IL-10 quando observamos sua ação durante o EF moderado (Van Meegeren et al., 2012). Portanto, considerando sua atividade protetora aos condrócitos, é de se esperar que sua regulação positiva também atue diminuindo a secreção de outros mediadores pró-inflamatórios como IL-1β, IL-6 e TNF-α, como observamos nos resultados da lL-4 nos grupos treinados (Schuerwegh et al., 2003).

Além disso, fatores de crescimento geralmente são relacionados a estados anabólicos, assim sendo, podem contribuir também para o desenvolvimento e recuperação

da cartilagem articular como é o (TGF-β), associado à condrogênese, proliferação de condrócitos, acúmulo de componentes da MEC e diferenciação terminal de condrócitos.

O TGF-β induz condrócitos a expressarem moléculas da MEC específicas da cartilagem, como colágeno tipo II e proteoglicanos, para formar o tecido cartilaginoso (Silva et al., 2009a, 2009b). Em um estudo utilizando animais knockout com deficiência de TGF-β, estes animais apresentaram características de degeneração articular espontânea semelhante a OA em humanos com perda de tecido cartilaginoso, fibrose sinovial e formação de osteófitos (Silva et al., 2009a).

O nosso estudo mostrou que o EF moderado no solo foi eficiente para estimular uma maior concentração do TGF-β e desta forma estimamos que possa ter contribuído para obtenção de um maior número de condrócitos quantificados nos grupos tratados com EF. Contudo, foi observada diferença estatística somente no grupo EF solo, demonstrando que está terapia com EF foi capaz de contribuir com a manutenção da arquitetura articular (Moulharat et al., 2004; Tchetina et al., 2007).

Avaliamos também a produção tecidual de (TNF-α), citocina pró-inflamatória, que está associada via de regra a EF intensos e agudos. É regulada principalmente pela via de sinalização de receptores (TLR) e NFkB (Tromm et al., 2012; Leandro et al., 2007; Castrogiovanni et al.,2019; Silva et al., 2009b; Leandro et al., 2022). Já o efeito crônico do EF moderado sugere uma diminuição na produção do TNF-α, diminuição da síntese de IL-1β e aumento da IL-10 e IL4, reforçando a natureza anti-inflamatória do EF prescrito com intensidade moderada (Tromm et al., 2012; Tomazoni et al., 2017; Pinho et al., 2010; Cerqueira et al., 2020; Baker et al., 2011; Woodell-May e Sommerfeld, 2020; Gleeson et al., 2011).

A produção aumentada de IL-6 nos miócitos com características anti-inflamatórias durante o treinamento, induz um feedback negativo que inibe a produção de TNF-α pelas células sinovióticas articulares do tipo “A”, caracterizando um efeito positico agudo da IL6m nas sessões de EF (Castrogiovanni et al., 2019; Benatti e Pedersen, 2015; Gleeson et al., 2011; Starrkie et al., 2003). Um estudo realizado em roedores corrobora com essa afirmação, nele observaram a elevação do TNF-α e da IL-1β nos grupos onde foi induzida a OA por Iodoacetato monossódico (MIA) e uma redução significativa destes biomarcadores inflamatórios nos animais que realizaram EF de moderada intensidade 3 dias por semana, por 8 semanas, em esteira ergométrica como forma de tratamento (Martins et al., 2019).

A compressão moderada, imposta pelo EF, pode proporcionar também um ambiente “anticatabólico” que permitirá uma diminuição na supressão de TNF-α dentro da articulação.

Um estudo avaliou as respostas *in vitro* em diferentes faixas de compressão (10, 20 e 30%) na MEC de cartilagens bovinas, e evidenciou que compressões ajustadas são benéficas para a minimização da ação pró-inflamatória. No presente estudo os resultados demonstraram que tanto o EF moderado no solo como na água, pelos mecanismos citados sobre o TNF-α, foram capazes de direcionar o processo inflamatório para uma troca fenotípica mais rápida de M1 para M2, atenuando a manutenção exacerbada da fase inflamatória aguda (Kumar et al., 2010; Gleeson et al., 2011).

Na presente pesquisa, os protocolos de intervenção propostos propiciaram alterações bioquímicas e moleculares nos grupos tratados, modulando positivamente, o processo inflamatório e de formação de estresse oxidativo, através do estímulo imposto pelo EF moderado nas articulações osteoartríticas. Como consequência a este processo de melhoria dos quadros inflamatórios e de estresse oxidativo, é esperado o início do reparo tecidual que tem como objetivo reconstituir os tecidos lesados durante o processo da OA (Sellam e Berenbaum, 2010; Robins, et al., 2013; Castrogiovanni et al., 2019; Zahan et al., 2020).

Nesta evolução terapêutica de reparo do tecido articular, o condrócito tem papel primordial, estando envolvido tanto em processos catabólicos, tornando-se fonte mais acelerada de produção de metaloproteinases, quanto de processos anabóbicos como o envolvimento na síntese de colágeno II, proteoglicanos e fatores de crescimento dentro do ambiente articular. Contudo, é o efeito sobre o desequilíbrio entre estes dois eventos que determinará se a terapêutica utilizada surtiu efeito histológico esperado nas células articulares (Pritzker et al., 2006; Sellam e Berenbaum, 2010).

Estudos experimentais têm demonstrado que o EF moderado modula a expressão de IL-1β e eleva o número de condrócitos em cortes histológicos de animais que foram submetidos a treinamentos físicos moderados (Martins et al., 2019; Akkiraju e Noge, 2015). Obtivemos resultados quantitativos de aumento das células condrocíticas nas análises histológicas, o que evidencia que o EF surtiu efeito benéfico estrutural na articulação (Fox et al., 2009; Akkiraju e Nohe, 2015).

O presente estudo confirmou que a OA desempenha mecanismos fisiopatológicos envolvidos na apoptose de condrócitos, visto que, ao analisarmos o quantitativo por lacuna destas células, encontramos no grupo OA, uma diminuição significativa em relação ao grupo SHAM. Podemos interpretar também que o EF no solo foi capaz de modular positivamente o número de condrócitos, contribuindo assim, para que o reparo tecidual dentro do ambiente articular tivesse início, o que é muito importante visto a relevância

positiva que os condrócitos desempenham quando atuam de forma anabólica no ambiente articular (Pritzker et al., 2006; Robins, et al., 2013).

Adiante, apesar se apresentarem tendências de melhora, entende-se que mudanças significativas na espessura da cartilagem e espessura da superfície de contato dos grupos tratados seriam os próximos eventos morfológicos alterados positivamente pela ação do EF. No entanto, acreditamos que embora o tempo total de execução do treinamento estivesse de acordo com a maioria dos artigos revisados para este fim, o fato de não encontrarmos alterações significativas nestes dois parâmetros está relacionado, em tese, a uma menor exposição de sessões de EF dentro do nosso protocolo e isso talvez tenha sido um limitante do estudo.

O tratamento da OA é, portanto, um grande desafio terapêutico devido a complexa rede de fatores envolvidos na fisiopatologia da doença. O processo de reparo tecidual é dependente da prévia modulação de processos moleculares e bioquímicos que foram alterados pelo EF moderado no estudo. A discussão destes dados demonstra que o assunto necessita de contínuas investigações, ampliando assim, os conhecimentos sobre estratégias terapêuticas não farmacológicas que auxiliem no tratamento da OA.

6 CONCLUSÃO

O exercício físico de moderada intensidade proporcionou redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, aumento da citocinas anti-inflamatórias, e promoveu modulação do estado redox celular. Além disso proporcionou aumento no número de condrócitos nos animais que foram tratados com EF em esteira. Portanto, evidencia-se que, dentro dos parâmetros avaliados no presente estudo, o EF no solo possuiu melhores características ao enfrentamento da doença de OA de joelho.

Todavia, os resultados não apresentaram alterações significativas na espessura e na superfície de contato da cartilagem, provavelmente porque mudanças estruturais serão observadas após as mudanças bioquímicas e moleculares do tecido afetado, sugerindo que prazos de protocolo maiores poderiam revelar estes tipos de alterações.

Por fim, com base nos apontamentos do estudo, o EF moderado, principalmente no solo, pode ser considerado um método conveniente para o tratamento da osteoartrite. Principalmente porque, quando comparado a outras modalidades terapêuticas, como a intervenção cirúrgica (invasiva) e uso de medicamentos que podem acarretar em efeitos colaterais indesejáveis, o EF pode ser considerado uma forma de tratamento segura capaz de prover também benefícios sobre inúmeros sistemas, não restritos apenas ao sistema osteomuscular.

Contudo, mais estudos que investiguem outros aspectos do EF como frequência, período e duração, assim como sua influência sobre outros fatores, se fazem necessários para tentar entender sua complexidade de atuação frente as características da OA.

REFERÊNCIAS

Aaron RK, Racine J, Dyke JP. Contribution of Circulatory Disturbances in Subchondral Bone to the Pathophysiology of Osteoarthritis. Curr Rheumatol Rep. 2017;19(8):49.

Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. Trends Pharmacol Sci. 2006;27(12):639-45.

Aebi, H. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 1984;105:121-26.

Aguiar AS, Tuon T, Pinhom CA., Silvam LA, Andreazzam AC, Kapczinskim F, et al. Intense exercise induces mitochondrial dysfunction in mice brain. Neurochem Res. 2008;33(1):51–58.

Akkiraju, H, and Nohe, A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. J. Dev. Biol. 2015;3:177–192.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2001;302(2-3):141-5.

Altay MA, Ertürk C, Bilge A, Yaptı M, Levent A, Aksoy N. Evaluation of prolidase activity and oxidative status in patients with knee osteoarthritis: relationships with radiographic severity and clinical parameters. Rheumatol Int. 2015;35(10):1725-31.

Altindag O, Erel O, Aksoy N, Selek S, Celik H, Karaoglanoglu M. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. Rheumatol Int. 2007;27(4):339-44.

Andrade TAM. et al. Skin changes in streptozotocin-induced diabetic rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017;490(4)1154-61.

Andreesen R, Gadd S, Brugger W, Löhr GW, Atkins RC. Activation of human monocyte-derived macrophages cultured on Teflon: response to interferon-gamma during terminal maturation in vitro. Immunobiology. 1988;177(2):186-98.

Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. J Orthop Res. 2003;21:451e7.

Assis L, Milares LP, Almeida T, Tim C, Magri A, Fernandes KR, Medalha C, Renno AC, Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats, Osteoarthr. Cartil. 2016;24:169–177.

Australia A. Painful realities: the economic impact of arthritis in Australia in 2007. Arthritis Australia. 2007:1–88.

Bagi CM, Berryman E, Zakur DE, Wilkie D, Andresen CJ. Effect of antiresorptive and anabolic bone therapy on development of osteoarthritis in a posttraumatic rat model of OA. Arthritis research & therapy.2015,17:315.

Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metab. 2011;13(1):11-22.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for sod. Meth Biochem Anal. 1987; 32:279-312.
Bartels EM, Juhl CB, Christensen R, Hagen KB, Danneskiold-Samsøe B, Dagfinrud H, Lund H. Aquatic exercise for the treatment of knee and hip osteoarthritis. Cochrane Database Syst Rev. 2016;3:CD005523.

Beecher BR, Martin JA, Pedersen DR, Heiner AD, Buckwalter JA. Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death. Iowa Orthop J. 2007;27:1-8.

Benatti, FB, Pedersen, BK. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. Nature reviews. Rheumatology. 2015;11(2):86–97.

Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophageproduced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2010;62:647–657.

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, ButterWeld DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. J Neurol Sci. 2005;233:145–162.

Carlo MD Jr, Loeser RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. Arthritis Rheum. 2003;48(12):3419-30.

Carmeli E, Reznick AZ, Coleman R, Carmeli V. Muscle strength and mass of lower extremities in relation to functional abilities in elderly adults. Gerontology. 2000;46(5):249–257.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. Arch Biochem Biophys. 1996;328(2):309-16.

Castrogiovanni P, Di Rosa M, Ravalli S, Castorina A, Guglielmino C, Imbesi R, Vecchio M, Drago F, Szychlinska MA, Musumeci G. Moderate Physical Activity as a Prevention Method for Knee Osteoarthritis and the Role of Synoviocytes as Biological Key. Int J Mol Sci. 2019;20(3):511.

Cechella JL, Leite MR, Dobrachinski F, da Rocha JT, Carvalho NR, Duarte MM, Soares FA, Bresciani G, Royes LF, Zeni G. Moderate swimming exercise and caffeine supplementation reduce the levels of inflammatory cytokines without causing oxidative stress in tissues of middle-aged rats. Amino Acids. 2014;46(5):1187-95.
Cerqueira, É., Marinho, D. A., Neiva, H. P., & Lourenço, O. (2020). Inflammatory Effects of High and Moderate Intensity Exercise-A Systematic Review. Frontiers in physiology. 2020;10:1550.

Chadjichristos C, Ghayor C, Kypriotou M, Martin G, Renard E, Ala-Kokko L, Suske G, de Crombrugghe B, Pujol JP, Galéra P. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. J Biol Chem. 2003;278(41):39762-72.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by cross-linked hemoglobin. Biomaterials. 2004; 25:843–850.

Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. J Biol Chem. 1955;217(1):383-93.

Chilibeck PD, Bell GJ, Socha T, Martin T. The effect of aerobic exercise training on the distribution of succinate dehydrogenase activity throughout muscle fibres. Can J Appl Physiol.1998;23(1):74-86.

Cifuentes DJ, Rocha LG, Silva LA, Brito AC, Rueff-Barroso CR, Porto LC, Pinho RA. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18(8):1088-95.

Cisternas MG, Murphy L, Sacks JJ, Solomon DH, Pasta DJ, Helmick CG. Alternative Methods for Defining Osteoarthritis and the Impact on Estimating Prevalence in a US Population-Based Survey. Arthritis Care Res. 2016;68(5):574-80.

Clements KM, Price JS, Chambers MG, Visco DM, Poole AR, Mason RM. Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. Arthritis Rheum. 2003;48(12):3452-63.

Dannaway J, New CC, New CH, Maher CG. Aquatic exercise for osteoarthritis of the knee or hip. Br J Sports Med. 2017;51(16):1233-1234.

Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, et al, Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. J Appl Physiol. 2008;104(5): 1436-41.

De Lisio M, Kaczor JJ, Phan N, Tarnopolsky MA, Boreham DR, Parise G. Exercise training enhances the skeletal muscle response to radiation-induced oxidative stress. Muscle Nerve. 2011;43(1): 58-64.

De Lucas RD, Caputo F, Mendes de Souza K, Sigwalt AR, Ghisoni K, Lock Silveira PC, Remor AP, da Luz Scheffer D, Guglielmo LG, Latini A. Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. J Sports Sci. 2014;32(1):22-30.

Del Carlo M Jr, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. Arthritis Rheum. 2002;46:394-403.

Drevet S, Gavazzi G, Grange L, Dupuy C, Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. Exp Gerontol. 2018;111:107-117.

Ertürk C, Altay MA, Selek S, Koçyiğit A. Paraoxonase-1 activity and oxidative status in patients with knee osteoarthritis and their relationship with radiological and clinical parameters. Scand J Clin Lab Invest. 2012;72(5):433-9.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radic Biol Med. 2003;35(3):236-56.

Fehrenbacher A, Steck E, Rickert M, Roth W, Richter W. Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants in vitro. Arch Biochem Biophys. 2003;410(1):39-47.

Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Banes AJ, Guilak F. The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. J Orthop Res. 2001;19(4):729-37.

Fernandes, JC; Martel-Pelletier, J; Pelletier, JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology. 2002;39:237–246.

Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. Free Radic Biol Med. 2007;42(2):153-64.

Filho M, dos Santos HDP, Zaccaron RP, de Bem SG, de Roch CL, Lupselon FS, Alves N., de Sousa MS, do Bomfim, F, de Andrade, T, Machado-de-Ávila, RA., Silveira P. Intra-articular treatment with hyaluronic acid associated with gold nanoparticles in a mechanical osteoarthritis model in Wistar rats. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2021;39(12):2546–2555.

Fischer, C.P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? Exerc Immunol Rev. 2006;12:6-33.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. Clin Chim Acta. 1985;153(1):23-36.

Flohé L, Gunzler W. Assay of glutatione peroxidase. Methods Enzymology.1984;105:114-21.

Galois, L., Etienne, S., Grossin, L., Watrin-Pinzano, A., Cournil-Henrionnet, C., Loeuille, D., et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. Osteoarthritis Cartilage.2004;12: 779–786.

Giannoni P, Siegrist M, Hunziker EB, Wong M. The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein. Biorheology. 2003;40:101e9.

Gibson JS, McCartney D, Sumpter J, Fairfax TP, Milner PI, Edwards HL, Wilkins RJ. Rapid effects of hypoxia on H+ homeostasis in articular chondrocytes. Pflugers Arch. 2009;458(6):1085-92. doi: 10.1007/s00424-009-0695-6.

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nat Rev Immunol. 2011;11(9):607-15.

Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. The Lancet. 2015;386(9991):376-87.

Gomez JE, Thurston GB. Comparisons of the oscillatory shear viscoelasticity and composition of pathological synovial fluids. Biorheology. 1993;30(5-6):409-27.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. J Physiol. 2005;567:113-20.

Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. Free Radic Biol Med. 2008;44(2): 126-31.

Green A, Engstrom C, Friis P. Exercise: an essential evidence-based medicine. Med J Aust. 2018;208(6):242-243.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007;43(2):619-624.

Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. J Immunol. 1990;144(2):499-505.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect. 1994;102:105- 12.

Halliwell B, Gutteridge MC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: University Press; 2007.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med. 1991;91(3):14S-22S.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. Med Sci Monit. 2001;7(4):801-19.

Haubruck P, Pinto MM, Moradi B, Little CB, Gentek R. Monocytes, Macrophages, and Their Potential Niches in Synovial Joints - Therapeutic Targets in Post-Traumatic Osteoarthritis?. Frontiers in immunology. 2021;12:763702.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell. 2008;132:344–362.

Hellsten, Y., Nielsen, J. J., Lykkesfeldt, J., Bruhn, M., Silveira, L., Pilegaard, H., & Bangsbo, J. Antioxidant supplementation enhances the exercise-induced increase in mitochondrial uncoupling protein 3 and endothelial nitric oxide synthase mRNA content in human skeletal muscle. Free radical biology & medicine. 2007;43(3), 353–361.

Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(8):643-54.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 1976;74(1):214-26.

Hollander J; Fiebig R; Gore M; Ookawara T; Ohno H; Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. Pflügers Archiv European Journal of Physiology. 2001;442:426-424.

Hong Y, Kim H, Lee Y, Lee S, Kim K, Jin Y, Lee SR, Chang KT, Hong Y. Salutary effects of melatonin combined with treadmill exercise on cartilage damage. Journal of pineal research. 2014;57(1):53–66.

Hsieh YL, Yang CC. Early intervention of swimming exercises attenuate articular cartilage destruction in a rat model of anterior cruciate ligament and meniscus knee injuries. Life Sci. 2018;1;212:267-274.

Hunter CJ, Imler SM, Malaviya P, Nerem RM, Levenston ME. Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen I gels. Biomaterials 2002;23:1249e59.

Insall J. (1971). A midline approach to the knee. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, *53*(8), 1584–1586.

Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Yamaguchi S, Nagai M, Kiyan W, Zhang X, Kuroki H. Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. Osteoarthritis and cartilage. 2016;24(6):1092–1102.

Ishii H; Tanaka H; Katoh K; Nakamura H; Nagashima M.; Yoshino S. Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2- type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. Osteoarthr. Cartil. 2002;10:277–281.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. Arch Histol Cytol. 2000;63(1):17-31.

Jenei-Lanzl, Z.; Meurer, A.; Zaucke, F. Interleukin-1_ signaling in osteoarthritis—chondrocytes in focus. Cell. Signal. 2019:53:212–223.

Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I, Sudo T, Kojima T, Okamoto F, Fukushima H, Okabe K, Ohya K, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. Nat Med. 2004;10:617–624.

Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, Terkeltaub R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. Arthritis Rheum. 2000;43:1560-1570.

Kang C, O'Moore KM, Dickman R, Ji LL. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. Free Radic Biol Med. 2009;47(10):1394-400.

Kapoor M, Martel-Pelletier J., Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Nature reviews. Rheumatology. 2011;7(1), 33–42.

Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunit and is functionally impaired and misassembled. J Neurosci. 2006;19:5256–5264

Kelly P, Kahlmeier S, Götschi T, Orsini N, Richards J, Roberts N, Scarborough P, Foster C. Systematic review and meta-analysis of reduction in all-cause mortality from walking and cycling and shape of dose response relationship. Int J Behav Nutr Phys Act. 2014;11:132.

Kirk B, Feehan J, Lombardi G, Duque G. Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. Current osteoporosis reports. 2020;18(4):388-400.

Kishimoto, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Research. 2006.

Knobloch TJ, Madhavan S, Nam J, Agarwal Jr S, Agarwal S. Regulation of chondrocytic gene expression by biomechanical signals. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2008;18:139e50.

Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. Arthritis Rheum. 2005;52(2):479-87.

Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shah AA, Shmagel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. Arthritis Care Res. 2020;72(2):149-162.

Kong, H., Wang, X. Q., & Zhang, X. A. Exercise for Osteoarthritis: A Literature Review of Pathology and Mechanism. Frontiers in aging neuroscience. 2022;14:854026.

Kühn K, Shikhman AR, Lotz M. Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. J Cell Physiol. 2003;197(3):379-87.

Kumar V; Abbas AK; Fausto N; Aster JC. Robbins e Cotran, Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Labonte AC, Tosello-Trampont AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. Mol Cells. 2014;37(4):275-85.

Lammert E, Zeeb M. Metabolism of Human Diseases: Organ Physiology and Pathophysiology: Springer Vienna; 2014.

Leandro C, Nascimento E, Manhães-De-Castro R, Duarte JA, De-Castro CMMB. Exercício Físiso E Sistema Imunológico: Mecanismos E Integrações. Revista Portuguesa De Ciências Do Desporto. 2002;2(5):80-90.

Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, Pithon-Curi TC. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. J Strength Cond Res. 2007;21(3):751-6.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondys SC. Evaluation of the probe 2',7'- dichiorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem. Res. Toxicol. 1992;5:227–231.

Leeuwenburgh C; Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. Current Medicinal Chemistry 8:829-838. 2001.

Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. Biochim Biophys Acta. 1990;1052(3):366-78.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in enzymology. 1990;186:464-478.
Li D, Xie G, Wang W. Reactive oxygen species: the 2-edged sword of osteoarthritis. Am J Med Sci. 2012;344(6):486-90.

Li Y, Frank EH, Wang Y, Chubinskaya S, Huang HH, Grodzinsky AJ. Moderate dynamic compression inhibits pro-catabolic response of cartilage to mechanical injury, tumor necrosis factor-α and interleukin-6, but accentuates degradation above a strain threshold. Osteoarthritis Cartilage. 2013;21(12):1933-41.

Linden B. Osteochondritis dissecans of the femoral condyles: a long-term follow-up study. J Bone Joint Surg Am. 1977;59(6):769-76.

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. Arthritis Rheum. 2012;64(6):1697-707.

Long P, Gassner R, Agarwal S. Tumor necrosis factor a-dependent proinflammatory gene induction is inhibited by cyclic tensile strain in articular chondrocytes in vitro. Arthritis Rheum 2001;44:2311e9.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of biological chemistry. 1951;193:265-275.

Lu, J., Feng, X., Zhang, H., Wei, Y., Yang, Y., Tian, Y., et al. Maresin-1 suppresses IL-1β-induced MMP-13 secretion by activating the PI3K/AKT pathway and inhibiting the NF-κB pathway in synovioblasts of an osteoarthritis rat model with treadmill exercise. Connect. Tissue Res. 2021;62:508–518.

Ma Z, Wang Y, Piao T, Liu J, Echinocystic acid inhibits IL-1b-induced COX-2 and iNOS expression in human osteoarthritis chondrocytes. Inflammation. 2016;39: 543-549.

Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP. Arthritis and Allied Conditions. In: Koopman WJ e Moreland LW. A Textbook of Rheumatology 15th edn. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Martins JB, Mendonça VA, Aguiar GC, da Fonseca SF, Dos Santos JM, Tossige- Gomes R, Melo DS, Oliveira MX, Leite HR, Camargos ACR, Ferreira AJ, Coimbra CC, Poortmans J, Oliveira VC, Silva SB, Domingues TE, Bernardo-Filho M, Lacerda ACR. Effect of a Moderate-Intensity Aerobic Training on Joint Biomarkers and Functional Adaptations in Rats Subjected to Induced Knee Osteoarthritis. Front Physiol. 2019;10:1168.

Martins, J. B., Mendonça, V. A., Aguiar, G. C., da Fonseca, S. F., Dos Santos, J. M., Tossige-Gomes, R., Melo, D. S., Oliveira, M. X., Leite, H. R., Camargos, A., Ferreira, A. J., Coimbra, C. C., Poortmans, J., Oliveira, V. C., Silva, S. B., Domingues, T. E., Bernardo-Filho, M., & Lacerda, A. Effect of a Moderate-Intensity Aerobic Training on Joint Biomarkers and Functional Adaptations in Rats Subjected to Induced Knee Osteoarthritis. Frontiers in physiology. 2019;10:1168.

Mathiessen, A.; Conaghan, P.G. Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with therapeutic implications. Arthritis Res. Ther. 2017;19:18.

Mauck RL, Byers BA, Yuan X, Tuan RS. Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. Biomech Model Mechanobiol. 2007;6:113e25.

McAllister TN, Frangos JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways. J Bone Miner Res. 1999;14(6):930-6
.
Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428-35.

Migita K, Yamasaki S, Kita M, Ida H, Shibatomi K, Kawakami A, et al. Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. Immunology. 2001;103:362-367.

Mio K, Saito S, Tomatsu T, Toyama Y. Intermittent compressive strain may reduce aggrecanase expression in cartilage: a study of chondrocytes in agarose gel. Clin Orthop Relat Res. 2005;433:225e32.

Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, et al. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. 2021;22(17):9208.

Moscardi L. C. et al. Lasertherapy as A Strategy for Treatment Healing under Caloric Restriction–Study in Rats. J. Pharmacy and Pharmacol. 2018; 6:647-658.
Mostafa, E.; Chollet-martin, S.; Oudghiri, M.; Laquay, N.; Jacob, M.; Michel, J.; Feldman, L.J. Effects of interleukin-10 on monocyte/ endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. Cardiovasc. Res. 2001;49:882–890.

Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P, De Ceuninck F, Sabatini M. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. Osteoarthritis Cartilage. 2004;12(4):296-305.

Moulton PJ, Hiran TS, Goldring MB, Hancock JT. Detection of protein and mRNA of various components of the NADPH oxidase complex in an immortalized human chondrocyte line. Br J Rheumatol. 1997;36:522-529.

Murata M, Bonassar LJ, Wright M, Mankin HJ, Towle CA. A role for the interleukin-1 receptor in the pathway linking static mechanical compression to decreased proteoglycan synthesis in surface articular cartilage. Arch Biochem Biophys 2003;413:229e33.

Musumeci G. The Effect of Mechanical Loading on Articular Cartilage. J Funct Morphol Kinesiol. 2016;1:154–161.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992;6:3051-3064.

Ohashi W., Hattori K., Hattori Y. Control of Macrophage Dynamics as a Potential Therapeutic Approach for Clinical Disorders Envolving Chronic Inflammation. J Pharmacol. Exp Ther. 2015;354:240–250.

Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. Curr Biol. 2012 Sep 11;22(17):R733-40.

Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, Zon- Giebel A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. Osteoarthritis Cartilage. 2006;14(2):139-45.

Packer L, Cadenasa E, Davies KJA. Free radicals and exercise: an introduction. Free Radical Biology and Medicine. 2008;44:123-125.

Park S, Hung CT, Ateshian GA. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. Osteoarthritis Cartilage 2004;12:65e73.

Paździor M, Kiełczykowska M, Kurzepa J, Luchowska-Kocot D, Kocot J, Musik I. The Oxidative Stress in Knee Osteoarthritis Patients. An Attempt of Evaluation of Possible Compensatory Effects Occurring in the Disease Development. Medicina (Kaunas). 2019;55(5):150.

Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. J Appl Physiol. 1985;103(3):1093-1098, 2007.

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. J Appl Physiol. 2005;98(4):1154-62.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biol Int.2006;30(10):848-53.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola, A. C., Zago, M. S., Silveira, P. C., Dal-Pizzol, F., & Moreira, J. C Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell biology international. 2006;30(10):848–853.

Pinho RA, Silva LA, Pinho CA, Scheffer DL, Souza CT, Benetti M, Carvalho T, Dal- Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race. Clin J Sport Med. 2010;20(4):306-11.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage. 2006;14(1):13-29.

Qian J, Liang J, Wang Y, Wang H. (2014). Effect of passive motion on articular cartilage in rat osteoarthritis. Exp. Ther. Med. 8, 377–383.

Qin J, Barbour KE, Murphy LB, Nelson AE, Schwartz TA, Helmick CG, Allen KD, Renner JB, Baker NA, Jordan JM. Lifetime Risk of Symptomatic Hand Osteoarthritis: The Johnston County Osteoarthritis Project. Arthritis Rheumatol. 2017;69(6):1204- 1212.

Quinn TM, Grodzinsky AJ, Buschmann MD, Kim YJ, Hunziker EB. Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants. J Cell Sei. 1998;111:573–583.

Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. Free Radic Biol Med. 1999;27(1- 2):69-74.

Radak Z, Tahara TK, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. Free Radic Biol Med. 1999;27:69-74.

Ragan PM, Badger AM, Cook M, Chin VI, Gowen M, Grodzinsky AJ, Lark MW. Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration. J Orthop Res. 1999;17(6):836-42.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. J Clin Invest. 1996;97(9):2011-9.

Regan EA, Bowler RP, Crapo JD. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. Osteoarthritis Cartilage. 2008;16(4):515-21.

Rios JL, Boldt KR, Mather JW, Seerattan RA, Hart DA, Herzog W. Quantifying the Effects of Different Treadmill Training Speeds and Durations on the Health of Rat Knee Joints. Sports Med Open. 2018;4(1):15.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. Immunity. 1997; 6(3):315-325.

Rosa SC, Judas F, Lopes MC, Mendes AF. Nitric oxide synthase isoforms and NF- kappaB activity in normal and osteoarthritic human chondrocytes: regulation by inducible nitric oxide. Nitric Oxide. 2008;19(3):276-83.

Scheffer D, Latini A.. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease. 2020;1866(10):165823.

Schuerwegh, A.J.; Dombrecht, E.J.; Stevens, W.J.; Van Offel, J.F.; Bridts, C.H.; De Clerck, L.S. Influence of pro-inflammatory (IL-1_, IL-6, TNF-_, IFN-) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. Osteoarthr. Cartil. 2003;11:681–687.

Schulze-Tanzil, G.; Zreiqat, H.; Sabat, R.; Kohl, B.; Halder, A.; Muller, R.; John, T. Interleukin-10 and Articular Cartilage: Experimental Therapeutical Approaches in Cartilage Disorders. Curr. Gene Ther. 2009;9:306–315.

Scott WN. Insall & Scott: Cirurgia do Joelho. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(11):625-35.

Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, Mobasheri A. Curcumin protects human chondrocytes from IL-l1β –induced inhibition of collagen type II and β1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study. Ann Anat. 2005;187:487–497.

Shikichi M, Kitamura HP, Yanase H, Konno A, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. Arch Histol Cytol. 1999;62(3):219-29.

Silva LA, Pinho CA, Rocha LG, Tuon T, Silveira PC, Pinho RA. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. Appl Physiol Nutr Metab. 2009;34(1): 60-5.

Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, et al. b. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. Eur J Appl Physiol. 2009;105(6): 861-7.

Silva LE, Valim V, Pessanha AP, Oliveira LM, Myamoto S, Jones A, Natour J. Hydrotherapy versus conventional land-based exercise for the management of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Phys Ther. 2008;88(1):12-21.

Fox SAJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports Health. 2009;1:461–468.

Soran N, Altindag O, Cakir H, Celik H, Demirkol A, Aksoy N. Assessment of paraoxonase activities in patients with knee osteoarthritis. Redox Rep. 2008;13(5):194-8.

Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M. & Pedersen, B. K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-α production in humans. FASEB J. 2003;17:884–886.

Strobel NA, Peake JM, Matsumoto A, Marsh SA, Coombes JS, Wadley GD. Antioxidant Supplementation Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis. Med Sci Sports Exerc. 2011;43(6):1017-24.

Sutton AJ, Muir KR, Mockett S, Fentem P. A caseecontrol study to investigate the relation between low and moderate levels of physical activity and osteoarthritis of the knee using data collected as part of the Allied Dunbar National Fitness Survey. Ann Rheum Dis 2001;60:756e64.

Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, Burr DB, Turner CH, Yokota H. Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. Calcif Tissue Int. 2005;76(4):261-71.

Tchetina EV, Kobayashi M, Yasuda T, Meijers T, Pidoux I, Poole AR. Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of MMP-13 and collagenase activity: implications for development and arthritis. Matrix Biol. 2007;26(4):247-58.

Thomas AC, Hubbard-Turner T, Wikstrom EA, Palmieri-Smith RM. Epidemiologia da osteoartrite pós-traumática. J Athl Train. 2017;52(6):491-496.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;288(2):345-53.

Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. J Immunol. 1990;145(2):690-6.

Tomazoni SS, Leal-Junior EC, Pallotta RC, Teixeira S, de Almeida P, Lopes-Martins RA.. Effects of photobiomodulation therapy, pharmacological therapy, and physical exercise as single and/or combined treatment on the inflammatory response induced by experimental osteoarthritis. Lasers in medical science.2017;32(1):101–108.

Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1824(1):133-45.

Tromm CA. Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. Rev. bras. cineantropom. desempenho hum.,2012;14(1):52-60.

Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. Arthritis Care Res. 2020;72(2):149-162.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.

Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, Saed-Nejad F, Fischer SG, Mow VC, et al. A load controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. Arch Biochem Biophys 1998;353:29e36.

Van der Kraan PM, Blaney END, Blom A, van den Berg WB.TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of

signaling pathways through receptor-Smads. Osteoarthritis and cartilage. 2009; 17(12):1539–1545.

Van Meegeren MER, Roosendaal G, Jansen NWD, Wenting MJG, Van Wesel ACW, Van Roon JAG, Lafeber FPJG. IL-4 alone and in combination with IL-10 protects against blood-induced cartilage damage. Osteoarthr. Cartil. 2012;20:764–772.

Wadhwa S, Choudhary S, Voznesensky M, Epstein M, Raisz L, Pilbeam C. Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2002;297(1):46-51.

Wang C, Zeng L, Zhang T, Liu J, Wang W, Tenuigenin prevents IL-1b-induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes by suppressing PI3K/AKT/ NF-kB signaling pathway, Inflammation. 2016;39:807e812.

Wedell-Neergaard AS, Lang Lehrskov L, Christensen RH, Legaard GE, Dorph E, Larsen MK, Launbo N, Fagerlind SR, Seide SK, Nymand S, Ball M, Vinum N, Dahl CN, Henneberg M, Ried-Larsen M, Nybing JD, Christensen R, Rosenmeier JB, Karstoft K, Pedersen BK, Ellingsgaard H, Krogh-Madsen R. Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. Cell Metab. 2019 Apr 2;29(4):844-855.e3.

Wittenauer R, Smith L, Aden K. Background Paper 6.12 Osteoarthritis. In: Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation" Update on the 2004 Background Paper. 2013;6:12.

Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. Mediat. Inflamm. 2014:1–19.

Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society. 2020;38(2):253-7.

Wu D, Jin S, Lin Z, Chen R, Pan T, Kang X, Huang H, Lin C, Pan J. Sauchinone inhibits IL-1β induced catabolism and hypertrophy in mouse chondrocytes to attenuate osteoarthritis via Nrf2/HO-1 and NF-κB pathways. Int Immunopharmacol. 2018;62:181- 190.

Yang, Y., Wang, Y., Kong, Y., Zhang, X., Zhang, H., Gang, Y., et al. Mechanical stress protects against osteoarthritis via regulation of the AMPK/NF-kB signaling pathway. J. Cell. Physiol. 2019;234:9156–9167.

Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. Horm Metab Res. 2007;39(10):707-9.

Zahan OM, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. Med Pharm Rep. 2020;93(1):12-22.

ANEXO 1

Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **11/08/2020**.

Título do projeto	Efeitos do exercício de baixa-moderada intensidade no solo e na água em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar.
Project title	Effects of a performance of low-moderated intensity within soil and water mechanical model of osteoarthritis in Wistar rats
Número do protocolo **Protocol number**	51/2020
Pesquisador principal **Principal Investigator**	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores **Researchers**	Leandro Almeida da Silva, Daniela Pacheco Dos Santos Haupenthal, Carolini Mendes, Gustavo De Bem, Laura de Roch Casagrande, Rubya Pereira Zacaron, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, João Vitor Silvano Bittencourt, Lígia Milanez Venturini.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2020 a 01/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / *Wistar*
Idade/Peso	60 dias/ 200-300g
Número de animais	48 Masculino
Procedência	Biotério2 UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 11 de agosto de 2020.

Fernando Carvalho

Fernando Carvalho
Coordenador da CEUA

.