

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO**

**ATIVIDADE FÍSICA NO TRATAMENTO DE ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE DE FREUND: EFEITOS NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E
MIGRAÇÃO CELULAR**

RAQUEL PINHEIRO GOMES

**FLORIANÓPOLIS - SC
2008**

**ATIVIDADE FÍSICA NO TRATAMENTO DE ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE DE FREUND: EFEITOS NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E
MIGRAÇÃO CELULAR**

Por

RAQUEL PINHEIRO GOMES

Dissertação do Mestrado em Ciências do
Movimento Humano da Universidade do
Estado de Santa Catarina - UDESC.

Prof. Dra. Susana Cristina Domenech (orientadora)
(UDESC)

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi (co-orientador)
(UFSC)

Florianópolis – SC

2008

RAQUEL PINHEIRO GOMES

**ATIVIDADE FÍSICA NO TRATAMENTO DE ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE DE FREUND: EFEITOS NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E
MIGRAÇÃO CELULAR**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado em Ciências do Movimento Humano pela Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Banca Examinadora:

Orientador:

Dra. Susana Cristina Domenech
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Dr. Eduardo Kokubun
Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho

Membro:

Dr. Édio Petroski
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro:

Dra. Monique da Silva Gevaerd Loch
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Dra. Stella Maris Michaelsen
Universidade do Estado de Santa Catarina

Florianópolis, 2008

Ao meu avô Manoel Gomes
e ao meu irmão Daniel Gomes,
pelo incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por tudo;

À minha família, pelo amor e compreensão;

Aos meus orientadores Susana Cristina Domenech e Carlos Rogério Tonussi, pelos ensinamentos e pela confiança;

À doutoranda Elisângela Bressan, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Aos professores Dr. Sebastião Iberes Lopes Melo, Dr. Ruy Jornada Krebs, Dr. Noé Gomes Borges Jr e Dra. Monique da Silva Gevaerd, pelos ensinamentos;

Aos funcionários do CEFID - UDESC, em especial ao Maércio, Solange, Nivaldo e Jane pela paciência e dedicação;

Aos funcionários do biotério da UFSC, em especial ao Pedro, pela dedicação;

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia da Nocicepção do Departamento de Farmacologia da UFSC, pela amizade e companheirismo;

Aos colegas do laboratório de Instrumentação do CEFID - UDESC, pela amizade e companheirismo;

À ex-bolsista Tatiane Morgana da Silva, pela dedicação;

Aos amigos Elisabete Maria de Oliveira, Juliane de Oliveira, André Cruz, Affonso Kullevicz da Silva, Raquel Petry e Salviano Nobre pelo conhecimento que adquirimos juntos e pela amizade;

Ao Adriano, por todo amor e paciência;

Aos meus tios Sebastião Pinheiro Gomes, Roseli Gueths e Teresa Bandeira, pelo amor e incentivo;

Aos amigos Majoi Ainá, Brian Tani, Karine Arasaki e Vitor Santos, pela amizade e dedicação;

Ao amigo Thiago Cristiano Beviláqua, pela amizade (em memória);

Aos meus amigos do centro espírita, pela amizade;

A todos os amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao programa de bolsas de monitoria da pós-graduação (PROMOP – UDESC), pelo apoio financeiro;

RESUMO

ATIVIDADE FÍSICA NO TRATAMENTO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE DE FREUND: EFEITOS NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E MIGRAÇÃO CELULAR

Autora: Raquel Pinheiro Gomes

Orientador: Prof. Dra. Susana C. Domenech; Co-orientador: Prof. Dr. Carlos R. Tonussi

O exercício físico apresenta potenciais benefícios na artrite, retardando a incapacidade funcional e melhorando a função das articulações. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da atividade física sobre a nocicepção, edema e migração celular em ratas com artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), como também verificar se a possível liberação endógena de corticóides durante o exercício podem influenciar na nocicepção e no edema. Ratos *Wistar* fêmeas (200 – 250 g; n=50) receberam injeção intradérmica de CFA (*Mycobacterium butiricum*; 0,5 mg/mL; 50 µL) na base da cauda e, após 21 dias, os animais receberam injeção de CFA na articulação tíbio-femural (TF) ou tíbio-társica (TT). A incapacitação articular foi avaliada pelo tempo de elevação da pata (TEP, s) durante marcha forçada de 1 minuto sobre um cilindro em rotação (3 r.p.m.). A variação do edema inflamatório da articulação TF e TT foi avaliada pelo aumento do diâmetro articular (DA, cm) e pelo aumento do volume de pata (EA, mL), respectivamente. Ambos, incapacitação e edema foram avaliados durante 10 dias consecutivos. Dois protocolos de exercício foram avaliados: (a) exercício diário de 1 min, onde os animais realizaram 1 minuto de exercício no cilindro, sendo este o próprio teste de incapacitação; (b) exercício progressivo, onde os animais realizaram o exercício com aumento de 1 minuto por dia (realizado sempre após o teste de incapacitação); (c) Grupo controle (TF e TT), sem exercício, cuja incapacitação foi mensurada apenas no 1º, 5º e 10º dias após a injeção intra-articular de CFA. Finalizado os 10 dias de avaliação, os animais foram eutanasiados para a realização da contagem total (CT; células/mm³) e diferencial (mononucleares - MON e polimorfonucleares - PMN; células/mm³) de leucócitos do tecido inflamado. O exercício progressivo inibiu a incapacitação e o edema em ambas as articulações. Entretanto, houve redução da migração total de leucócitos apenas na articulação TF. O exercício de 1 min inibiu o edema para as duas articulações e reduziu a migração total de leucócitos da articulação TT. Porém, o efeito do exercício de 1 minuto na incapacitação não foi significativo. A administração de aminoglutetimida (50 mg/kg; oral) 1 hora antes do exercício mostrou não ter efeito sobre a redução da nocicepção e edema ocasionados pelo exercício. O exercício progressivo parece ser mais efetivo em reduzir os parâmetros inflamatórios em comparação ao exercício de 1 min. Este estudo demonstra que a atividade física regular pode contribuir consistentemente para melhorar a funcionalidade articular e também apresentar um efeito anti-inflamatório.

Palavras-chaves: 1. Artrite Reumatóide. 2. Atividade Física.
3. Incapacitação Articular. 4. Adjuvante Completo de *Freund*.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

Florianópolis, 2008.

ABSTRACT

PHYSICAL ACTIVITY IN THE TREATMENT OF CFA-INDUCED ARTHRITIS: EFFECT ON NOCICEPTION, EDEMA AND CELL MIGRATION.

Author: Raquel Pinheiro Gomes

Adviser: Prof. Dra. Susana C. Domenech; Co-adviser: Prof. Dr. Carlos R. Tonussi

Physical activity is thought to be beneficial to arthritis, delaying disability and/or improving joint function. The aim of the present study was to evaluate the effects of exercise on nociception, edema and cell migration in two groups of rats with CFA-induced arthritis, as well as verify whether the possible endogenous liberation of corticoids while exercising can have an influence on the nociception and edema. Arthritis was induced in female Wistar rats (200 - 250 g, n=50) by subcutaneously injecting complete Freund's adjuvant (CFA; *Mycobacterium butyricum*, 0.5 mg/mL; 50 μ L) into the base of the tail and, after 21 days, into the right knee joint (TF) or right ankle joint (TT). Incapacitation was measured daily by the paw elevation time (TEP; s) in 1-min periods of observation on a revolving cylinder (3 r.p.m.). The variation of inflammatory edema of the knee and ankle joints was evaluated by the variation of the articular diameter (DA, cm) and by the paw volume variation (EA, mL), respectively. Both, incapacitation and edema were measured during 10 consecutive days. Two protocols of exercise were evaluated: (a) in the 1-minute exercise group, the animals performed 1 minute of daily exercise on the cylinder, this exercise being the incapacitation test itself; (b) for the progressive exercise group the duration of daily exercise increased by 1 minute per day (the additional exercise was always done just after the daily incapacitation test); (c) in the control groups (TF and TT), incapacitation was evaluated only on the 1st, 5th and 10th days after intra-articular CFA injection. After completion of the trials the animals were euthanized and the articular inflammatory exudate was sampled for total (CT; cells/mm³) and differential leukocyte counts (mononuclear - MON, and polymorphonuclear - PMN, cells/mm³). The progressive exercise protocol inhibited incapacitation and edema for both the knee and ankle joints. However, cell migration was inhibited only in the knee joint. The daily 1-min exercise reduced edema in both knee and ankle joints, while cell migration was inhibited only in the ankle joint. The effect on incapacitation was not significant in this protocol. Aminoglutetimide (50 mg/kg; oral) 1 hour before exercise did not modify the antinociceptive and antiedematogenic effect of exercise in this model. By comparison, progressive exercise seemed to be more effective in reducing the inflammatory parameters than 1-min exercise. Although other exercise protocols need to be evaluated, this study suggests that regular physical activity can consistently contribute to improving joint function, as well as present an anti-inflammatory effect.

Key words: 1. Rheumatoid Arthritis. 2. Physical Activity.
3. Articular Incapacitation. 4. Complete Freund's Adjuvant.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

Florianópolis, 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xii
ACRÔNIMOS E ABREVIACÕES	xvi
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Problema	20
1.2 Justificativa	22
1.3 Objetivos	24
1.3.1 Objetivo Geral	24
1.3.2 Objetivos Específicos	25
1.4 Hipóteses	25
1.4.1 Hipótese Geral	25
1.4.2 Hipóteses Específicas	26
1.5 Variáveis Experimentais	27
1.5.1 Definições Conceituais e Operacionais das Variáveis	27
1.6 Delimitação do Tema	29
1.7 Limitações do Estudo	30
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 A Artrite Reumatóide	31
2.1.1 O Joelho e o Tornozelo na Artrite	35
2.1.2 Dor e Inflamação na Artrite	37
2.2 Artrite Induzida por Adjuvante Completo de <i>Freund</i> (CFA)	39
2.2.1 Histórico do CFA	39
2.2.2 Indução da Doença	42
2.2.3 Vias de Imunização	42

2.2.4 Curso da Doença	43
2.3 Tratamento da Artrite Reumatóide	45
2.3.1 Tratamento Fisioterapêutico da Artrite Reumatóide	46
2.3.2 A Atividade Física e Exercícios e a Artrite Reumatóide	47
3. METODOLOGIA	51
3.1 Característica da Pesquisa	51
3.2 Animais	51
3.2.1. Critérios de Exclusão	52
3.3 Materiais e Métodos	53
3.3.1 Materiais	53
3.3.2. Métodos	54
3.3.2.1 Protocolo Experimental	54
3.3.2.2 Injeção Intradérmica	59
3.3.2.3 Injeção Intra-Articular	60
3.3.2.4 Padronização do Modelo de Indução da Artrite por Adjuvante Completo de <i>Freund</i>	60
3.3.2.5 Protocolos de Atividade Física	61
3.3.2.6 Avaliação da Incapacitação Articular	62
3.3.2.7 Avaliação do Edema Articular	63
3.3.2.8 Eutanásia dos Animais	64
3.3.2.9 Leucograma do Fluido Sinovial	65
3.3.2.10. Avaliação do Corticóide Endógeno	66
3.4 Análise Estatística	66
4 RESULTADOS	68
4.1 Primeira Etapa: Padronização do Modelo de Artrite por CFA	68
4.2 Etapa 2: Protocolo de 1 Minuto de Exercício Diário	78
4.3 Etapa 3: Protocolo de Exercício Progressivo	82
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Drogas, reagentes e equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais. 53
- TABELA 2.** Etapa 1: experimentos realizados para a padronização do modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). M, machos; F, fêmeas; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Mb, *Mycobacterium butyricum*; TF, articulação tíbio-femural; TT, articulação tíbio-társica; BC, base da cauda; SF, solução fisiológica 0,9 %. 58
- TABELA 3.** Etapas 2: divisão e classificação dos grupos participantes do exercício de 1 minuto após a padronização do modelo de artrite por adjuvante (etapa 1). TF, articulação tíbio-femural; TT, articulação tíbio-társica; E1: grupo que realizou exercício de 1 minuto; E0: grupo que não realizou o exercício de 1 minuto. 58
- TABELA 4.** Etapa 3: divisão e classificação dos grupos participantes do exercício progressivo. TF, articulação tíbio-femural; TT, articulação tíbio-társica; EP: grupo que realizou exercício progressivo; E00: grupo que não realizou o exercício progressivo. 59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapa 1 do estudo: a padronização do modelo de artrite por CFA. 56
- Figura 2.** Etapa 2 do estudo: Após indução de artrite por CFA, foi realizado o exercício de 1 minuto diário e realizadas as análises de incapacitação e edema articulares e coleta do líquido sinovial. 56
- Figura 3.** Etapa 3 do estudo: Após indução de artrite por CFA, foi realizado o exercício progressivo e realizadas as análises de incapacitação e edema articulares e coleta do líquido sinovial. 57
- Figura 4.** (A) sapatilhas metálicas acopladas na pata traseira do rato; (B) aparelho pra deambulação forçada (esquerda) e sistema de registro da incapacitação articular (direita). 63
- Figura 5.** Edema articular das articulações tíbio-femural e tíbio-társica. A) Medida do diâmetro articular da articulação tíbio-femural; B) Medida do edema de pata da articulação tíbio-társica. 64
- Figura 6:** Leucócitos mononucleares (MON) e polimorfonucleares (PMN) em lâmina confeccionada para a contagem diferencial. 66

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** - (EXP 1) Efeito de duas administrações intra-articulares (0 e 8° dia) na TF, com 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na incapacitação articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 69
- GRÁFICO 2** - (EXP 1) Efeito de duas administrações intra-articulares (0 e 8° dia) na TF, com 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, no diâmetro articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 69
- GRÁFICO 3** - (EXP 2) Efeito da administração de 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, o 1° estímulo na base da cauda e o 2° estímulo na articulação TF, na incapacitação articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 71
- GRÁFICO 4** - (EXP 2) Efeito da administração de 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, o 1° estímulo na base da cauda e o 2° estímulo na articulação TF, no diâmetro articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 71
- GRÁFICO 5** - (EXP 3) Efeito da administração de 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na base da cauda (1° estímulo) e na articulação TF (2° estímulo), no edema articular de machos (n=6). Dados analisados a partir da reinjeção e expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 73
- GRÁFICO 6** - (EXP 3) Efeito da administração de 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na base da cauda (1° estímulo) e na articulação TF (2° estímulo), na incapacitação articular de machos (n=6). Dados analisados a partir da 2° injeção e expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 73
- GRÁFICO 7** - (EXP 4): Efeito da administração de 50 µL (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1° estímulo) e na articulação TT (2° estímulo), no edema articular de fêmeas (n=6; ○). O grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1° estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TT (2° estímulo) (n=6; ■). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 75

GRÁFICO 8 - (EXP 4): Efeito da administração de 50 µL (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1° estímulo) e na articulação TT (2° estímulo), na incapacitação articular de fêmeas (n=6; ○). O grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1° estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TT (2° estímulo) (n=6; ■). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 75

GRÁFICO 9 – (EXP 5): Efeito da administração de 50 µL (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1° estímulo) e na articulação TF (2° estímulo), na incapacitação articular de fêmeas, grupo CFA / CFA (n=6; ○). Um grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1° estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TF (2° estímulo), grupo CFA / salina (n=6; ■). Outro controle recebeu os dois estímulos com solução fisiológica (0,9), grupo salina / salina (n=6; ▽). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 77

GRÁFICO 10 – (EXP 5): Efeito da administração de 50 µL (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1° estímulo) e na articulação TF (2° estímulo), no diâmetro articular de fêmeas, grupo CFA / CFA (n=6; ○). Um grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1° estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TF (2° estímulo), grupo CFA / salina (n=6; ■). Outro controle recebeu os dois estímulos com solução fisiológica (0,9), grupo salina / salina (n=6; ▽). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). 78

GRÁFICO 11 - Efeito do exercício de 1 minuto na incapacitação articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student* para $p \leq 0.05$. 79

GRÁFICO 12 - Efeito do exercício de 1 minuto na incapacitação articular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TT E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student* para $p \leq 0.05$. 80

GRÁFICO 13 - Efeito do exercício de 1 minuto no diâmetro articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.001$ (***). 80

GRÁFICO 14 - Efeito do exercício de 1 minuto no edema de pata da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TT E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.001$ (***). 81

- GRÁFICO 15** - Efeito do exercício de 1 minuto diário na migração celular na articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student* para $p \leq 0.05$. 81
- GRÁFICO 16** - Efeito do exercício de 1 minuto diário na migração celular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TT E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.05$ (*) e $p \leq 0.01$ (**). 82
- GRÁFICO 17** - Efeito do exercício progressivo na incapacitação articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF EP, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TF E00; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.01$ (**). 83
- GRÁFICO 18** - Efeito do exercício progressivo na incapacitação articular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT EP, n=7) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TT E00; n=7) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=14). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.01$ (**). 84
- GRÁFICO 19** - Efeito do exercício progressivo no diâmetro articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF EP, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TF E00; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.001$ (***). 84
- GRÁFICO 20** - Efeito do exercício progressivo no edema de pata da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT EP, n=7) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TT E00; n=7) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=14). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.001$ (***). 85
- GRÁFICO 21** - Efeito do exercício progressivo na migração celular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 µL). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *student*, $p \leq 0.05$ (*) e $p \leq 0.01$ (**). 85
- GRÁFICO 22** - Efeito do exercício progressivo na migração celular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=7) com artrite induzida por CFA (0,5

mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E0; n=7) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=14). Utilizou-se teste t de student, $p \leq 0.05$.

86

GRÁFICO 23 - Efeito da administração de aminoglutetimida (50mg/kg; grupo amino, n=6) na incapacitação articular durante o exercício progressivo realizado em ratos fêmeas com artrite induzida por CFA na articulação tíbio-társica. O grupo controle (grupo água; n=6) recebeu água. Utilizou-se teste t de student, $p \leq 0.05$.

87

GRÁFICO 24 - Efeito da administração de aminoglutetimida (50mg/kg; grupo amino, n=6) no edema articular, durante o exercício progressivo realizado em ratos fêmeas com artrite induzida por CFA na articulação tíbio-társica. O grupo controle (grupo água; n=6) recebeu água. Utilizou-se teste t de student, $p \leq 0.05$.

87

GRÁFICO 25 - Efeito da administração de aminoglutetimida (50mg/kg; grupo amino, n=6) na migração de leucócitos durante o exercício progressivo realizado em ratos fêmeas com artrite induzida por CFA na articulação tíbio-társica. O grupo controle (grupo água; n=6) recebeu água. Utilizou-se teste t de student, $p \leq 0.05$.

88

ACRÔNIMOS E ABREVIACÕES

A...

ACR - Colégio Americano de Reumatologia

AINE - antiinflamatórios não esteróides

APC - *antigen-presenting cell*

A.R. Artrite reumatóide

B...

BC – Base da cauda

C...

CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias

CEFID – Centro de Ciências da Saúde e do Esporte

CETEA – Comitê de ética em experimentação animal da UDESC

CEUA- Comissão de ética no uso de animais (UFSC)

CFA - Adjuvante Completo de *Freund*

CT – Células Totais

D...

DA - Diâmetro articular

DMARDS - *Disease Modifying Anti Rheumatic Drug* (drogas anti-reumáticas modificadoras da doença)

E...

xvii

EA – Edema articular

E0 – grupo que não realiza o exercício de 1 minuto (grupo controle)

E00 – grupo que não realiza o exercício progressivo (grupo controle)

E1 – grupo que realizou o exercício de 1 minuto

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EP – grupo que realiza o exercício progressivo

E.P.M – Erro padrão da média

EXP - experimento

F...

F – fêmeas

H...

HSP - *heat shock protein*

I...

IA – Incapacitação articular

IASP - *International Association for the Study of Pain*

i.art. – injeção intra-articular

i.d. – injeção intra-dérmica

IFA - adjuvante incompleto de *Freund*

IL-1 - interleucina 1

L...

LABIN - Laboratório de Instrumentação

LANEN - Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção

M...

M - machos

Mb – *Micobacterium butyricum*

MHC - *major histocompatibility complex*

Mt – *Micobacterium Tuberculosis*

MON – Células mononucleares

P...

p – probabilidade de significância

PMN – Células polimorfonucleares

R...

r.p.m – rotações por minuto

rad/s – radianos por segundo

S...

Salina ou SF– solução fisiológica (0,9 %)

T...

TEP- Tempo de elevação da pata

TFN - fator de necrose tumoral

TF – articulação Tíbio-femural

TT- articulação Tíbio-Társica

U...

UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROBLEMA

A artrite reumatóide (A.R.) é a doença auto-imune mais comum, de prevalência mundial estimada de 1 % a 1,5 % (KHURANA; BERNEY, 2005), que ocorre em todas as partes do mundo e em todas as etnias (BRANDÃO; FERRAZ; ZERBINI, 1997), com incidência de 36:100000 mulheres e de 14:100000 homens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), com maior frequência entre a faixa etária de 30 a 50 anos (CARVALHO *et.al.*, 2000). Doença de caráter progressivo, os indivíduos acometidos com A.R. desenvolvem incapacidades funcionais e deformidades (LAURINDO *et.al.*, 2002). Esta realidade provoca importante impacto social e econômico devido ao afastamento do trabalho e pelo gasto das entidades públicas e privadas (BRESSAN, 2005).

Doença crônica, sistêmica, inflamatória e de etiologia desconhecida (KHURANA; BERNEY, 2005) é caracterizada por sinovite, presença de auto-anticorpos e pela formação do tecido de granulação denominado *pannus* que invade e destrói as estruturas próximas à articulação, tais como a cartilagem articular, o osso subcondral, os tendões e os ligamentos (FIRESTEIN, 2003). Em geral, esta afecção acomete grandes e pequenas articulações, de forma simétrica, em associação com manifestações sistêmicas, como rigidez matinal, fadiga e perda de peso, com um curso clínico flutuante, com períodos de melhora e exacerbação dos sintomas articulares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). O edema na sinóvia e nas estruturas periarticulares contribuem para a rigidez na artrite reumatóide por interferir na mecânica normal da articulação (KHURANA; BERNEY, 2005). Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos (LAURINDO *et.al.*, 2002).

A fisioterapia atua para restabelecer o maior grau funcional possível através de medidas analgésicas e exercícios terapêuticos de fortalecimento e alongamento da musculatura, com orientação e programas terapêuticos dirigidos à proteção articular e à manutenção do estado funcional do aparelho locomotor e do sistema cárdio-respiratório. Contudo, na fase aguda, geralmente se inicia o tratamento apenas com medidas analgésicas e, após a diminuição dos sintomas de dor e edema, fases subaguda e crônica, inicia-se a fase de fortalecimento com cuidados na proteção articular, que devem garantir o

fortalecimento da musculatura periarticular e um adequado programa de flexibilidade, evitando o excesso de movimento e privilegiando as cargas moderadas. A falta de prescrição do exercício desde o início do tratamento se deve a conceitos pré-concebidos de que o movimento articular pode agravar a dor e aumentar o edema dos pacientes com A.R. Apenas numa fase tardia o paciente inicia o condicionamento físico (LAURINDO *et. al.*, 2002). Porém, devido ao medo da sensação de dor, alguns pacientes dificilmente aderem aos programas de atividade física (SHIH *et.al.*, 2006).

A natureza crônica da artrite reumatóide contribui para a redução da força e resistência muscular, podendo gerar descondição e fadiga (CARVALHO *et.al.*, 2000). A prática de exercícios regulares em pacientes com A.R. está sendo encorajada por pesquisadores (ABELL *et.al.*, 2006; BENHAMOU, 2007; CARVALHO *et.al.*, 2000; SHIH *et.al.*, 2006) com o objetivo de prevenir comorbidades. A inclusão da atividade física com o objetivo de promover saúde e prevenir doenças e incapacidades foi tema de conferências realizadas nos Estados Unidos, como o Health People 2010 e a Conferência de Exercício e Atividade física promovida pelo Centro de Reabilitação e Pesquisa do Missouri, Colégio Americano de Reumatologia e pela Associação de Profissionais de Saúde de Reumatologia. Na Conferência de Exercício e Atividade física foi desenvolvido o Painel Especialista em Artrite e Atividade Física em 2002, o qual recomenda que indivíduos com artrite devem realizar, com segurança, 30 minutos de atividade física de intensidade moderada de, no mínimo, três vezes por semana (WORK GROUP RECOMMENDATIONS, 2003). Contudo, reumatologistas tradicionalmente não recomendam exercícios para pacientes com A.R., ou recomendam exercícios limitados sem utilização de pesos e dentro do limite de movimento, baseados em conceitos de que o movimento pode gerar dor, agravar a inflamação articular e acelerar os danos à articulação destes pacientes (BENHAMOU, 2007).

Estudos experimentais em animais permitem-nos analisar mais profundamente o prognóstico da artrite e observar as mudanças ocasionadas pela doença durante o tratamento por exercícios. Modelos experimentais que representem a artrite reumatóide humana têm sido desenvolvidos durante anos (YU *et.al.*, 2002). A artrite por adjuvante Completo de Freund é um modelo de doença auto-imune mediada por células T que se assemelha à artrite reumatóide (ZHANG *et.al.*, 1999), pois mimetiza os sinais e sintomas

da doença, incluindo as mudanças histopatológicas, a infiltração celular, a hipersensibilidade e edema da articulação afetada (BARTON *et.al.*, 2007). Este modelo experimental é bastante utilizado na busca de tratamentos farmacológicos adequados para a artrite reumatóide (WHITEHOUSE, 2007).

Admitindo um grande acometimento da região articular e mais precisamente da membrana sinovial na articulação do joelho ou tornozelo de animais com artrite induzida por CFA, questiona-se: A realização de atividade física pode diminuir a dor, o edema articular e a migração de leucócitos para o fluido sinovial em ratas com artrite induzida por adjuvante de Freund? Há influência da liberação endógena de corticóides, decorrente de stress, na incapacitação articular, edema articular e migração de leucócitos em ratas com artrite induzida por CFA durante a realização do exercício?

1.2 JUSTIFICATIVA

A Artrite Reumatóide foi considerada pelo centro de prevenção e controle de doenças dos Estados Unidos como um dos maiores problemas de saúde pública (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2001). Em 2002, afetou mais de 43 milhões de adultos (somente nos EUA), com custos atribuídos em 86 bilhões de dólares (SHIH *et.al.*, 2006). A A.R. é uma condição clínica potencialmente grave, não só pela morbidade associada à dor, à limitação funcional e à repercussão na qualidade de vida dos pacientes, mas também pela maior mortalidade, gerada pelas comorbidades associadas à doença, em relação à população geral (PINTO *et. al.*, 2006). Com a progressão da doença, estes indivíduos desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária quanto profissionais (LAURINDO *et. al.*, 2002) e apresentam mais dias sem saúde física e mental comparados a indivíduos sem artrite (ABELL *et. al.*, 2005). Indivíduos com artrite procuram duas vezes mais os centros de saúde que indivíduos não artríticos (RESNICK, 2001) e, dentre os artríticos, aqueles que não realizam atividade física apresentam duas vezes mais incapacidades funcionais que aqueles que praticam exercícios regulares (SHIH *et.al.*,2006).

Uma pesquisa recente realizada por Shih *et.al.* (2006) revelou que indivíduos com artrite são geralmente idosos, predominantemente mulheres, com baixa instrução, peso corporal acima do normal, apresentando freqüente ansiedade e depressão, limitações

funcionais e sociais, comorbidades associadas (tais como cardiopatias e osteoporose) e não realizam atividade física. Ekdhal *et.al.* (1989) demonstraram em estudo realizado na Suécia, que 80% dos pacientes com A.R. apresentavam alterações na resistência muscular e na coordenação dos membros inferiores e, que esta redução na capacidade física tem conseqüências graves com relação à auto-estima, sendo isto um fator desencadeador de depressão. A qualidade de vida relacionada à saúde é um bom indicador do impacto da doença, porque a A.R. raramente causa mortes, porém ocasiona dor e afeta substancialmente a funcionalidade.

Até pouco tempo atrás, profissionais da saúde (médicos, fisioterapeutas e outros) sugeriam que seus pacientes com A.R. evitassem exercícios e mantivessem o repouso (BENHAMOU, 2007). Entretanto, ainda se aconselha não realizar exercícios durante as crises (CAILLIET, 2001). No entanto, a inatividade pode acarretar fraqueza muscular, rigidez articular e limitação dos movimentos articulares (CARVALHO *et.al.*, 2000).

Estudos publicados por Vlieland (2003) sugerem que pacientes com artrite reumatóide podem se beneficiar com segurança de atividades físicas. O exercício físico regular está associado a baixas proporções de morte de adultos em qualquer idade, sempre que apenas níveis moderados de atividade física forem realizados (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002). A prática de exercícios ajuda a regular a pressão sanguínea, aumenta força muscular e óssea, aumenta a massa magra e diminui a massa gorda, melhora o bem-estar psicológico, reduz o risco de depressão e melhora o humor. Em idosos, a atividade física pode reduzir o risco de quedas e ajudar a manter independência nas suas atividades de vida diária (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002). Shih *et.al.* (2006) argumentam que a prática da atividade física tem mostrado benefícios para indivíduos com A.R. por diminuir significativamente a dor, melhorando a marcha e a função geral. Sendo assim, a atividade física está associada a uma melhor qualidade de vida entre indivíduos com artrite (ABELL *at. al.*, 2005). Porém, pacientes com artrite não costumam se engajar em programas de atividade física, devido à falta de aconselhamento por profissionais da saúde ou por medo de sentir dor (SHIH *et.al.*, 2006).

Considerando o grau de comprometimento físico e mental, o potencial incapacitante da artrite reumatóide e a melhora da qualidade de vida gerada pela prática de atividade

física, tornam-se necessárias pesquisas que verifiquem qual a influência do exercício no quadro clínico funcional de pacientes com esta afecção. Pesquisas realizadas em humanos são difíceis de serem controladas, pois testes repetidos tornam-se extenuantes e a adesão de pacientes para a coleta de dados se torna difícil pelo fato de que estes sentem medo de que a movimentação desde o início do tratamento, numa fase de exacerbação da doença, possa agravar a dor. Estudos *in vivo*, realizados em animais, podem gerar maiores informações sobre esta problemática. A utilização de um modelo de artrite induzida em animais tem a vantagem de poder fornecer dados sobre os efeitos reais do exercício na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos, o que em humanos seria difícil o controle diário dos pacientes, sobre seu comportamento ou pela possível ingestão de medicamentos que poderiam mascarar a situação, além da impossibilidade de alguns testes invasivos.

Através deste estudo pretende-se gerar dados que forneçam indicativos empíricos para a proposição de novos protocolos para o tratamento de A.R. por fisioterapeutas e educadores físicos. Constatando-se que pode não haver risco do exercício realizado na fase aguda da doença, médicos e fisioterapeutas seriam convencidos dos benefícios da atividade física desde o início do tratamento, ou seja, na fase aguda da doença, isto levaria a uma maior aderência dos pacientes ao tratamento.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da atividade física nos parâmetros de dor, edema e migração de leucócitos na articulação do joelho ou tornozelo de ratas com artrite induzida, sobre a ação nociceptiva e antiedematogênica do exercício no modelo experimental de artrite por Adjuvante Completo de Freund, como também verificar se a possível liberação endógena de corticóides durante o exercício podem influenciar na nocicepção e no edema.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um modelo de indução de artrite por injeção de adjuvante completo de Freund nas articulações do joelho e tornozelo em ratos que melhor se adequem aos objetivos propostos neste estudo;
- Comparar as medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do joelho de ratas artríticas submetidas a exercícios diários de um minuto com as do joelho de ratas que não realizam exercício;
- Comparar as medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do tornozelo de ratas artríticas submetidas a exercícios diários de um minuto com as do tornozelo de ratas que não realizam exercício;
- Comparar as medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do joelho de ratas artríticas submetidas ao exercício progressivo com as do joelho de ratas que não realizam exercício;
- Comparar as medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do tornozelo de ratas artríticas submetidas ao exercício progressivo com as do tornozelo de ratas que não realizam exercício;
- Verificar a possível influência da liberação endógena de corticóides durante a realização do exercício, na incapacitação articular e no edema articular em ratas com artrite induzida por CFA.

1.4 HIPÓTESES

1.4.1 HIPÓTESE GERAL

A hipótese geral deste trabalho baseia-se na possibilidade de que a atividade física durante 10 dias pode diminuir a dor, o edema e a migração de leucócitos na articulação do

joelho ou tornozelo de ratas com artrite induzida por adjuvante de Freund, sem a influência da liberação endógena de corticóides sobre a nocicepção e edema durante o exercício.

1.4.2 HIPÓTESES ESPECÍFICAS

- As medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do joelho de ratas com artrite induzida por CFA submetidas a exercícios diários de um minuto são menores que as do joelho de ratas com artrite induzida por CFA que não realizam o exercício;
- As medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do tornozelo de ratas com artrite induzida por CFA submetidas a exercícios diários de um minuto são menores que as do tornozelo de ratas com artrite induzida por CFA que não realizam o exercício;
- As medidas de dor, edema articular e migração de leucócitos do joelho de ratas com artrite induzida por CFA submetidas ao exercício progressivo são menores que as do joelho de ratas com artrite induzida por CFA que não realizam o exercício;
- As medidas de dor, o edema articular e a migração de leucócitos do tornozelo do grupo de ratas com artrite induzida por CFA submetidas ao exercício progressivo são menores que as do tornozelo de ratas com artrite induzida por CFA que não realizam o exercício;
- Não há influência da liberação endógena de corticóides na incapacitação articular e edema articular em ratas com artrite induzida por CFA durante a realização do exercício.

1.5 VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS

- Variável Independente: indução de artrite por adjuvante completo de Freund;
- Variáveis de Controle: atividade física (exercício de 1 minuto e o exercício progressivo); avaliação do corticóide endógeno;
- Variáveis Dependentes: dor, edema articular, migração de leucócitos.

1.5.1 DEFINIÇÕES CONCEITUAIS E OPERACIONAIS DAS VARIÁVEIS

A seguir serão descritas conceitualmente e operacionalmente as variáveis analisadas no estudo:

Artrite induzida por adjuvante: A artrite por adjuvante é um modelo experimental de doença auto-imune mediada por células T que se assemelha à artrite reumatóide humana (ZHANG et.al., 1999). O adjuvante completo de *Freund* (CFA) é composto por óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol como um surfactante em suspensão com uma micobactéria morta (BILLIAU; MATTHYS, 2001). As micobactérias que usualmente são utilizadas por pesquisadores para induzir artrite são o *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum*. Operacionalmente, a indução da artrite foi realizada por duas inoculações de 50 µL do adjuvante completo de *Freund* (0,5 mg/mL, DIFCO) contendo a *Mycobacterium butyricum*. A primeira injeção foi intradérmica na base da cauda de animais “naive” e, após 21 dias, a segunda injeção, intra-articular, no joelho ou tornozelo direito de ratas *Wistar*.

Atividade física: Caspersen *et.al.* (1985) definiram atividade física como qualquer movimento corporal, produzido pela musculatura esquelética, que resulta em gasto energético, podendo ser exemplificada por jogos, lutas, danças, esportes, exercícios físicos, atividades laborais e deslocamentos. Estes autores definiram exercício como um subconjunto da atividade física, o qual é planejado, estruturado e repetitivo que tem a finalidade de melhorar ou manter o condicionamento físico. Neste trabalho resolveu-se adotar o termo exercício para os protocolos escolhidos, admitindo estes como um subconjunto de atividade física, a qual no presente estudo representa a atividade de

deambulação. Operacionalmente realizaram-se dois protocolos: A) *exercício diário de 1 minuto*, no qual os animais realizaram 1 minuto de deambulação por dia, durante 10 dias consecutivos; B) *exercício progressivo*, no qual os animais realizaram o exercício de deambulação com aumento de 1 min por dia, perfazendo no décimo dia (consecutivo) dez minutos. Ambos os protocolos de atividade física foram realizados em um cilindro de aço inox, com velocidade contínua de 3 r.p.m. Em cada protocolo, os animais foram subdivididos nos grupos: experimental e controle. O grupo controle não realizou exercícios.

Dor: Uma desagradável experiência sensorial e emocional associada a real ou potencial dano tecidual, ou descrita em termos de tais danos (ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL PARA O ESTUDO DA DOR, 1983). A dor é mensurada pela medida de Incapacitação Articular proposta por Tonussi e Ferreira (1992), utilizada para mensuração de dor espontânea através da avaliação do estado funcional da articulação, que utiliza como parâmetro o *Tempo de Elevação da Pata (TEP)*, medido em segundos. O teste consiste em colocar os animais para deambular sobre um cilindro de aço inox, que se movimenta em rotação contínua com velocidade pré-determinada de 3 r.p.m. Sapatilhas metálicas são ajustadas na pata traseira de cada animal e conectadas à porta de entrada de dados do computador. Segundo Tonussi (1999), em animais sem estímulo articular o TEP varia em torno de 10 s. No presente trabalho, os animais, previamente treinados, foram submetidos à marcha forçada por um tempo de 60 s, registrando-se o tempo total que a pata posterior direita ficou sem tocar a superfície do cilindro (TEP).

Edema Articular: Perceptível acúmulo de fluidos em excesso na articulação (LOPES, 2005). No presente estudo, a avaliação do edema do joelho foi realizada através da medida do diâmetro articular, em centímetros (cm), com o auxílio de um paquímetro não digital (BRESSAN; CUNHA; TONUSSI, 2006). Para isso, os animais foram imobilizados, delicadamente, dentro de um cone de polietileno de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho que se desejava analisar. A avaliação do edema de pata ou edema do tornozelo foi realizada com o auxílio de uma balança eletrônica de precisão na qual foi adaptada uma cubeta preenchida com uma solução aquosa de sulfato de lauril (2,5 %) (DAHER; MELO; TONUSSI, 2005). A pata do animal foi submersa dentro da cubeta, até a

região imediatamente superior à articulação tíbio-társica e o volume de pata, em mL, foi mensurado pelo deslocamento da coluna líquida dentro da cubeta. Cuidados foram tomados para que as medidas fossem realizadas sempre no mesmo local, através da realização de uma marcação com caneta a prova d'água.

Migração de leucócitos para o fluido sinovial: Quantidade de leucócitos por milímetro cúbico que migram para o fluido sinovial (definida pelo autor). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através da coleta de 2 a 5 μL de fluido sinovial puro para a confecção de lâminas de vidro para leitura em microscópio óptico. Imediatamente após a coleta do fluido sinovial puro foi realizada uma lavagem da cavidade articular com 100 μL de solução fisiológica 0,9% e EDTA (5%) para a contagem total de leucócitos com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico (BRESSAN; CUNHA; TONUSSI, 2006).

Avaliação do corticóide endógeno: Consiste em avaliar o efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (inibidor da síntese endógena de corticóides) sobre a ação antinociceptiva e antiedematogênica durante o exercício no modelo de artrite induzida pelo CFA (definido pelo autor). Operacionalmente, consistiu em administrar aminoglutetimida por via oral e na dose de 50 mg/kg durante os 10 dias consecutivos, ou seja, nos mesmos dias em que os animais realizaram o exercício (n=6), que para esta avaliação escolheu-se o exercício progressivo. O tratamento diário foi realizado 1 hora antes do exercício. O grupo controle (n=6) recebeu apenas veículo (água destilada, via oral; 0,1 mL/100g).

1.6 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Este estudo avalia a influência da atividade física, através do exercício de deambulação de 1 minuto diário e progressivo, durante dez dias, na incapacitação, edema articular e na migração de leucócitos do joelho ou tornozelo de ratas com artrite induzida por adjuvante, como também, o efeito do pré-tratamento com inibidor da síntese endógena de corticóides sobre a ação antinociceptiva e antiedematogênica do exercício no modelo de artrite induzida pelo CFA.

1.7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- O experimento será realizado em ratos e não em humanos;
- A indução da artrite será realizada em apenas uma articulação, joelho ou tornozelo e somente na pata traseira direita;
- Apenas foram utilizados dois protocolos de exercícios de deambulação, não sendo utilizados outros tipos de atividade física;
- Não foi controlado o ciclo estral dos ratos *Wistar* fêmeas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória sistêmica de caráter auto-imune caracterizada pela presença de poliartrite crônica, de ordem simétrica e erosiva, podendo causar manifestações extra-articulares múltiplas, deformidades e redução da função articular (CARVALHO *et. al.*, 2000).

Esta doença afeta de 1 a 1,5 % da população mundial (KHURANA; BERNEY, 2005) sendo mais freqüente na população adulta (40 a 60 anos), porém pode acometer indivíduos de qualquer idade (BRANDÃO; FERRAZ; ZERBINI, 1997). As estimativas são de que em 2030 essa prevalência aumente consideravelmente (ABELL *et. al.*, 2005). A avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde tem sido utilizada como um bom indicador do impacto da artrite, uma vez que esta afecção raramente leva à morte, porém causa sintomas como dor, edema e rigidez articulares que afetam significativamente a funcionalidade. Pessoas com artrite apresentam mais dias sem saúde física e mental comparados a indivíduos sem artrite (ABELL *et. al.*, 2005).

A artrite reumatóide é uma das doenças crônicas auto-ímmunes que predominam nas mulheres (KHURANA; BERNEY, 2005). A taxa de incidência entre mulheres e homens é de aproximadamente 2 a 4 mulheres para cada homem (SILMAN, 2001). O motivo para esta diferença entre os sexos é desconhecido, mas pressupõe-se estar relacionado com questões hormonais e funções imunológicas (KHURANA; BERNEY, 2005). Pesquisas recentes realizadas através de levantamento de dados por entrevistas nos Estados Unidos revelaram que entre os indivíduos com artrite encontram-se principalmente as mulheres idosas, com menor instrução, com peso corporal acima do normal ou obesas, apresentando freqüentemente ansiedade e depressão. Estas mulheres também apresentam limitações funcionais e sociais, necessidade do uso de equipamentos especiais, comorbidades associadas (cardiopatias e osteoporose) e não realizam atividade física (SHIH *et.al.*, 2006). Com isso, as pacientes com artrite reumatóide apresentam maior risco para a redução e/ou perda da capacidade e da habilidade funcional (BENHAMOU, 2007).

A característica principal da artrite reumatóide é a simetria poliartétrica que afeta principalmente as mãos, os punhos e os pés. Porém, a maioria das articulações diartroidiais também é acometida (MACGREGOR, 1995). As grandes articulações geralmente tornam-se sintomáticas após as pequenas articulações. Apresentações assimétricas, com simetria desenvolvida no curso da doença, não são muito comuns (KHURANA; BERNEY, 2005).

A artrite reumatóide acomete as estruturas articulares, periarticulares e os tendões, porém a estrutura anatômica mais afetada é a membrana sinovial (CRUZ; BRANCO, 2002). A sinóvia normal, membrana que envolve as articulações, apresenta três camadas de células e estroma subsinovial avascularizado. Na artrite aguda, a membrana sinovial está espessada, hiperêmica e edematosa (GOLDING, 1998) e apresenta seis a dez camadas, com aumento de células do tipo A e B, dilatação venosa, alterações vasculares focais e segmentares, obstrução capilar, áreas de trombose, hemorragia perivascular e o estroma subsinovial entulhado por células mononucleares (SKARE, 1999). Em condições normais, o fluido sinovial não pode ser removido facilmente da cavidade articular do joelho de humanos. No joelho artrítico, volumes significativos podem ser aspirados da articulação: cerca de 70 mL (SCHAIBLE; GRUB, 1993). Em humanos, o líquido sinovial normal contém 10-200 células por mm^3 e o aspecto do líquido é claro e amarelado, em indivíduos com artrite reumatóide o líquido sinovial contém em média 20000 células por mm^3 e o fluido é escuro, turvo ou opaco e apresenta cor esverdeada (GOLDING, 1998).

A inflamação da sinóvia tem duração mínima de seis semanas, segundo os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (MACGREGOR, 1995). O diagnóstico da artrite reumatóide é realizado através de testes clínicos, pela atividade da doença, e laboratoriais, por marcadores laboratoriais como a Proteína C Reativa e velocidade de Eritrossedimentação, como também por estudos radiológicos (CAILLIET, 2001; LAURINDO *et.al.*, 2002; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2002). O curso da A.R. pode ser variável, desde acometimento leve e intermitente até forma mais grave e progressiva. Em (55-65) % dos casos inicia insidiosamente, de semanas para meses (BRANDÃO; FERRAZ; ZERBINI, 1997). De (8-15) % dos pacientes tem o início agudo dos sintomas, que atingem o ponto máximo em poucos dias (BRANDÃO; FERRAZ; ZERBINI, 1997).

As queixas principais dos pacientes com artrite reumatóide são dor e rigidez em múltiplas articulações, além dos sinais flogísticos locais e da limitação do movimento

articular. O enrijecimento das estruturas periarticulares e o edema sinovial impõem grave incapacidade às articulações envolvidas (BRANDÃO; FERRAZ; ZERBINI, 1997). A rigidez aparece mais acentuada no período matutino, em parte devido à redistribuição do líquido sinovial durante o sono (KHURANA; BERNEY, 2005). A dor e o edema promovem o repouso da articulação afetada pelo paciente artrítico, causando uma limitação da amplitude de movimento (PERRY, 2005). Outra queixa comum na artrite reumatóide é a fraqueza muscular, a qual interfere na habilidade do paciente em contrair os músculos (KHURANA; BERNEY, 2005). A dor, a rigidez articular, o edema e a fraqueza muscular são fatores que geram problemas biomecânicos futuros por promover deformidades funcionais e estruturais. Segundo Perry (2005), uma deformidade funcional existe quando os tecidos não permitem mobilidade passiva suficiente para atingir as posturas e amplitudes de movimento normais requeridas para uma marcha normal.

Em adição às manifestações articulares, o envolvimento sistêmico pode causar sintomas constitucionais (tal como perda de peso, níveis baixos de febre, mal estar), nódulos reumatóides e vasculite. Longo período de uso de corticosteróides, pelo paciente artrítico, pode também causar atrofia e fraqueza muscular, uma condição conhecida como miopatia esteróide (KHURANA; BERNEY, 2005). Estas manifestações extra-articulares da artrite reumatóide estão associadas com a mortalidade excessiva (TURESSON *et al.*, 2003). A severidade desta doença pode variar ao longo do tempo, mas normalmente a artrite reumatóide crônica resulta em desenvolvimento progressivo de vários graus de destruição articular, deformidade, significativa perda de funções e morte prematura (KHURANA; BERNEY, 2005).

Mesmo após décadas de pesquisas, a patogênese desta doença ainda não está completamente elucidada. Admite-se que os fatores que a desencadeiam sejam múltiplos, incluindo fatores imunes, genéticos e ambientais (KANNAN; KIMBEL; ORTMANN, 2005). Estudos têm demonstrado que uma porcentagem elevada de indivíduos que desenvolvem artrite reumatóide apresenta o antígeno de histocompatibilidade da classe II HLA-DR4 ou HLA-DRB1. Desta forma, a presença deste antígeno tem sido reconhecida como um fator de risco genético ao desenvolvimento da doença (KHURANA; BERNEY, 2005). Outras pesquisas indicam que o sistema imune inato pode estar envolvido no desenvolvimento da artrite reumatóide (através da ativação de receptores reconhecidos por

bactérias), o qual seria responsável pelo recrutamento de células inflamatórias para a cavidade articular culminando com a liberação de fatores como citocinas e prostaglandinas que contribuem para a perpetuação da inflamação (MÜLLER-LADNER, 2005). Alguns estímulos ambientais como infecções, vacinas e traumas emocionais também parecem estar implicados com o desenvolvimento da artrite reumatóide (KHURANA; BERNEY, 2005).

O antígeno leucocitário específico ao gene humano HLA-DR reside no complexo de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* - MHC), que participa na apresentação do antígeno. A célula apresentadora de antígenos (*antigen-presenting cell*, APC) reconhece o HLA-DR e apresenta para os linfócitos T. Estes linfócitos ativados proliferam e dão origem aos clones de células T. Na membrana sinovial, os linfócitos TCD4 positivos secretam mediadores inflamatórios, como a interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TFN), provavelmente pela possível persistência do estímulo antigênico. A reação se amplia com a produção destas e de outras citocinas pelos macrófagos, sinoviócitos, fibroblastos e células endoteliais (LAURINDO; TORIGOE, 2002). A sinóvia apresenta-se edematosa, com infiltrado linfocitário proeminente, formando folículos linfóides, rico em linfócitos T e plasmócitos. Macrófagos induzem a formação de uma rede extensa de vasos sanguíneos, angiogênese, na membrana sinovial. Linfócitos circulantes, principalmente os linfócitos T aderem-se ao endotélio de vênulas pós-capilares e migram através de suas paredes, alojando-se em vasos abaixo da sinóvia. Os linfócitos T ativam as células B que se proliferam e se diferenciam em plasmócitos que produzem fatores reumatóides. Estes formam complexos imunes que aumentam a permeabilidade vascular e promovem o acúmulo de células polimorfonucleares (SKARE, 1999). Sob a ação dos fatores de crescimento e proliferação dos fibroblastos e angiogênese, há a formação de um tecido granulomatoso, em particular na região de contato entre a membrana sinovial, cartilagem e osso, denominado *pannus*, com características tumorais, capaz de invadir e destruir a articulação (LAURINDO; TORIGOE, 2002). Seus mediadores agem degradando a cartilagem e inibindo a reabsorção óssea, promovendo erosão. Aspereza, afinamento e necrose focal da cartilagem são decorrentes da erosão provocada por enzimas provenientes do *pannus* (colagenases), das células do líquido sinovial (proteínases) e da própria cartilagem (elastases) (GOLDING, 1998). O *pannus* se organiza formando tecido fibroso

espesso que pode gerar anquilose fibrosa da articulação, causando assim deformidades estruturais (GOLDING, 1998).

2.1.1 O JOELHO E O TORNOZELO NA ARTRITE

A articulação tíbio-femoral é formada pela extremidade distal do fêmur e pelas superfícies proximais da tíbia (CAILLIET, 2001). Uma articulação sinovial típica apresenta suas duas superfícies articulares opostas cobertas de cartilagem e é fechada por uma cápsula que contém fluido sinovial, secretado pela sinóvia. Este lubrificante não é um óleo, é um fluido viscoso e tixotrópico constituído por moléculas bastante grandes e é um excelente absorvedor de choques devido a sua propriedade viscoelástica. A cápsula articular do joelho humano é grande e tem pouca profundidade. É uma membrana fibrosa fina reforçada pelos ligamentos colaterais que estabilizam o joelho. Os ligamentos são responsáveis por quase todo o suporte da articulação, enquanto os músculos provêm ação cinética. A estabilidade dinâmica do joelho depende das cargas impostas a ele, assim como da ação resultante dos músculos sobre a articulação (CAILLIET, 2001).

O joelho é comumente afetado na artrite reumatóide, apresentando inchaço, dor e calor (KHURANA; BERNEY, 2005). Muitos tecidos parenquimatosos são envolvidos, tais como: pequenas artérias, tendões, ligamentos e cápsulas articulares (CAILLIET, 2001). O acúmulo de líquidos é uma característica comum nos joelhos acometidos pela doença. Os líquidos reumatóides são escuros, turvos ou opacos, de baixa viscosidade, que se acumulam distendendo a articulação. A dor articular provém principalmente desta distensão da cápsula e ligamentos. A atrofia muscular é comum na artrite reumatóide e é mais pronunciada na musculatura inflamada (GOLDING, 1998). Restrição dos movimentos (particularmente a flexão), instabilidade e fraqueza ligamentar, que levam à deformação e atrofia do quadríceps, são freqüentemente observados. Esta restrição em flexão do joelho e o edema de moderado a grave aumentam a pressão intra-articular, que, por sua vez, podem causar um tracionamento de componentes posteriores do joelho, produzindo um cisto de Baker ou cisto poplíteo, o qual pode ser a causa de uma intensa trombose venosa (KHURANA; BERNEY, 2005). As cápsulas articulares e estruturas de suporte enfraquecidas e distendidas pelo tecido inflamado tornam esta articulação susceptível ao desenvolvimento

de frouxidão e incapacidade (HAMILL; KNUTZEN, 1999). De modo semelhante, os tendões sofrem um processo de dissolução fibrosa, alongamento e eventual ruptura. À medida que a doença progride, surgem deformidades devido a desequilíbrios musculares e ligamentares. No estágio tardio, a cartilagem articular e o osso subjacente tornam-se erodidos, havendo destruição da cartilagem, promovendo o estreitamento do espaço articular (ADAMS; HAMBLIN, 1994).

A biomecânica do pé e do tornozelo é complexa e estão intrinsecamente associadas. A articulação do tornozelo ou túbio-társica é do tipo troclear e constitui a articulação mais importante de todo um complexo articular da parte posterior do pé (KAPANJI, 1980). Este complexo de juntas consiste nas juntas tibiotalar, fibulotalar e tibiofibular. O pé é formado por 28 ossos intimamente relacionados e pelas articulações subtalar, talonavicular, calcaneocubóide, tarsometatarsal e intertarsal (NORDIN; FRANKEL, 2003). Todas as articulações da região posterior do tarso (tibiotalar, fibulotalar, subtalar, talonavicular e calcaneocubóide) formam um conjunto funcional indissociável cujo papel é de adaptar a orientação e a forma da abóbada plantar inteira (KAPANJI, 1980). A estabilidade do tornozelo depende da congruência articular e dos ligamentos medial, lateral e sidemótics (NORDIN; FRANKEL, 2003).

O envolvimento do pé é comum na doença precoce da artrite reumatóide, frequentemente ocorrendo erosões prematuras na base dos cinco metatarsos. As erosões prejudicam os ligamentos afrouxando-os, favorecendo o desvio lateral dos dedos do pé e subluxação plantar da cabeça dos metatarsos (KHURANA; BERNEY, 2005). A subluxação plantar torna-se particularmente importante, uma vez que, se for bastante severa, a cabeça do metatarso pode sobressair-se através da pele plantar e tornar-se infecciosa. O envolvimento dos tarsos e das inserções dos tendões associados é também comum, levando à dor ao movimento de inversão e eversão do pé, ao edema difuso e ao eritema no dorso do pé (KHURANA; BERNEY, 2005). O paciente reumático pode apresentar dificuldade de caminhar ou levantar o pé, dedos em flexão, queda do arco anterior com retificação do antepé, queda do arco longitudinal, hálux valgus progressivo, dor nos calcânhares e tendinite do tendão de Aquiles (GOLDING, 1998).

2.1.2 DOR E INFLAMAÇÃO NA ARTRITE

A maior sensação que é atribuída à articulação é a dor (SCHAIBLE; GRUBB, 1993). Esta sensação é caracterizada por hiperalgesia e dor espontânea (dor em repouso). Segundo a IASP (*International Association for the Study of Pain*), hiperalgesia é definida como uma resposta aumentada a um estímulo doloroso e, a dor é definida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a danos reais ou potenciais do tecido (MESKEY; BOGDUK, 1994). Uma sensibilidade dolorosa intensificada resulta da sensibilização do sistema nociceptivo.

Sherrington definiu os nociceptores como sendo fibras nervosas específicas, que agem como sistema de alarme, capaz de detectar danos teciduais ou estímulos potencialmente nocivos (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990). Estes nociceptores respondem a estímulos múltiplos, tais como estímulos mecânicos, de calor, de frio e estímulos químicos (RAJA *et.al.*, 1999). São classificados de acordo com a mielinização (fibras aferentes não-mielinizadas e fibras aferentes mielinizadas, fibras C e A, respectivamente), com o estímulo que provoca a resposta (térmico, mecânico e químico) e pela característica da resposta (coceira, ardência ou “agulhadas”). Os nociceptores também são classificados de acordo com a sensibilidade, pressão e ao movimento: a) unidades de baixo limiar que são excitadas por pressões inofensivas e pelo movimento articular; b) unidades de alto limiar que são ativadas apenas por pressões nocivas ou movimentos além do normal da articulação; c) unidades que respondem a fortes pressões na articulação, mas não respondem ao movimento, e d) unidades que não respondem a estímulos mecânicos, denominados nociceptores silenciosos (RAJA *et.al.*, 1999).

Os nociceptores da articulação estão localizados na cápsula articular, ligamentos, ossos, periósteo e próximo aos vasos, mas, provavelmente, não próximo à cartilagem articular. Estes são sensíveis à pressão e ao movimento articular. Em articulações normais, um estímulo doloroso seria evocado em extremos de movimento articular. Em artrites induzidas experimentalmente, estas respostas estão aumentadas e são observadas em todos os tipos de fibras aferentes (SCHAIBLE; SCHIMIDT, 1984). Esta sensibilização pode gerar a ativação de aferentes por movimentos no limite de amplitude de movimento articular e ativação por pressão (RAJA *et.al.*, 1999).

A inflamação na articulação causa sensibilização periférica, ou seja, aumento da sensibilidade de fibras de neurônios aferentes nociceptivos, e sensibilização central pela hiperexcitabilidade de neurônios nociceptivos do sistema nervoso central (SCHAIBLE; GRUBB, 1993). A inflamação é uma resposta ou reação de proteção crítica à irritação, injúria ou infecção, caracterizada por rubor, calor, inchaço, perda da função e dor (LEVINE; REICHLING, 1999). A inflamação envolve uma cascata de eventos que asseguram uma resposta rápida a lesões. Mediadores inflamatórios (bradicinina, fator ativador de plaquetas, citocinas e quimiocinas) agem em alvos específicos causando liberação local de outros mediadores de leucócitos (mastócitos e basófilos) e atraem outros leucócitos para o local da inflamação, por exemplo, neutrófilos (LEVINE; REICHLING, 1999). Os mediadores inflamatórios agem nos nociceptores aferentes primários causando dor por também induzir a atividade em nociceptores ou aumentar a resposta nociceptora evocada por outro estímulo (LEVINE; REICHLING, 1999).

A dor constitui um importante sintoma da artrite (YU *et.al.*, 2002). Segundo Schaible e Grubb (1993), a hiperalgesia em artrite ocorre quando a articulação é movimentada na sua amplitude de movimento ou quando leve pressão é aplicada na articulação. Por outro lado, uma pesquisa desenvolvida por Shih *et.al.* (2006), revelou que a dor está associada com a inatividade em pessoas com artrite, pois indivíduos que apresentam dor não procuram se engajar em programas de atividade física. Estes autores afirmam ainda que a dor é significativamente melhorada na parcela de indivíduos com artrite que se engajam em atividades físicas.

2.2 ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE *FREUND* (CFA)

O entendimento dos mecanismos pelos quais a artrite reumatóide se desenvolve baseia-se em estudos clínicos (BUCKLEY, 2003; FIRESTEIN, 2003; KHURANA; BERNEY, 2005; MÜLLER-LADNER, 2005) e em modelos experimentais em animais (BARS *et.al.*, 2001; KANNAN, ORTMANN; KIMPEL., 2005; SCHAIBLE; GRUBB, 1993). A indução de artrite em animais tem sido realizada através da administração de agentes artritogênicos como o pristane (VINGSBO, *et.al.*, 1996; ZHENG, *et.al.*, 2002), zymosan (GUERRERO *et.al.*, 2006) o adjuvante completo (BARTON *et.al.*, 2007; BILLIAU; MATTHYS, 2001; CAI *et.al.*, 2006; COOK; MOORE, 2005; COSTA *et.al.*, 1981; NAGAKURA *et.al.*, 2003; WHITEHOUSE, 2007; YU *et.al.*, 2002) e incompleto de *Freund* (CFA) (CANNON *et.al.*, 1993; ZHANG *et.al.*, 1999), entre outros.

2.2.1 HISTÓRICO DO CFA

A artrite induzida por adjuvante foi descrita primeiramente por Pearson em 1956, como uma doença induzida em ratos com susceptibilidade genética por uma inoculação simples de micobactéria (*Mycobacterium*) suspensa em óleo, substância conhecida como Adjuvante Completo de *Freund* (CFA) (WAUBEN, 1994). Carl Pearson foi um médico americano que pesquisou sobre as doenças musculares degenerativas. Durante a tentativa de induzir uma polimiosite através da injeção intramuscular de CFA, Pearson percebeu o desenvolvimento de uma artrite crônica nos animais. Com o auxílio de Fae Wood, Pearson padronizou um modelo experimental de artrite induzida por CFA. Este modelo reproduzia sinais e sintomas semelhantes aos da artrite reumatóide em humanos (PEARSON, 1956; TAUROG *et al.*, 1988).

Por mais de meio século, o adjuvante completo e o incompleto de *Freund* tem sido utilizados para a indução de artrite em animais. O adjuvante incompleto de *Freund* (IFA) é composto por óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol como surfactante. Já o adjuvante completo de *Freund* (CFA) contém os mesmos componentes do IFA com adição de uma micobactéria morta (BILLIAU; MATTHYS, 2001). As micobactérias que

usualmente são utilizadas por pesquisadores para induzir artrite são o *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum*.

Estudos realizados por Whitehouse *et.al.* (1974) no laboratório de Pearson estabeleceram que o desenvolvimento da artrite por adjuvante se deve tanto pela natureza do óleo utilizado para preparar o adjuvante, como também pela presença da peptidoglicana na parede celular da micobactéria que, segundo estes autores, constitui uma combinação que favorece o desenvolvimento da artrite.

A característica autoimune da artrite induzida por adjuvante foi primeiramente descrita por Pearson, quando este retirou clones de células T dos linfonodos de animais que receberam injeção de CFA e transferiu para animais naive, os quais desenvolveram subseqüentemente uma poliartrite (CARVALHO *et. al.*, 2002). Estudos posteriores demonstraram que a artrite induzida por adjuvante envolve a ativação de linfócitos T (YOSHINO; CLELAND, 1992). Outros estudos têm demonstrado que uma proteína presente na parede bacteriana seria a responsável por essa ativação das células T. Especificamente a HSP de 65 kDa (*heat shock protein*) estaria envolvida na patogênese desta artrite autoimune (GASTON *et. al.* 1989; HOLOSHITZ *et.al.*, 1986; HOLOSHITZ *et.al.*, 1984; MOUDGIL *et.al.*, 1997; QUAYLE *et.al.*, 2002; VAN EDEN *et.al.*, 1988, WAKSMAN, 2002).

Estudos de Gaston *et.al.* (1990) têm sugerido que existe uma seqüência determinada na proteína HSP, a seqüência de aminoácidos 180 a 188, que estaria especificamente envolvida na ativação das células T. Outras especulações ainda sugerem que a HSP das micobactérias apresentaria uma homologia na seqüência de aminoácidos com a HSP de 60 kDa humana. Isso poderia explicar uma reação cruzada entre HSP de espécies diferentes, o que daria origem à hipótese de uma possível participação destes microorganismos na etiopatogenia da artrite reumatóide (TSOULFA, 1989; RES, 1988).

A indução da artrite por CFA em animais tem revelado extensas variações na freqüência e severidade de lesões de acordo com as diferentes raças. Os camundongos geralmente não são susceptíveis à indução de artrite por adjuvante (WHITEHOUSE, 1974). Por outro lado, os ratos desenvolvem com maior facilidade a artrite induzida por CFA. No entanto, também ocorrem variações entre as diferentes espécies de ratos. Estudos que analisaram a severidade da artrite por adjuvante em quatro diferentes espécies de ratos tanto

machos como fêmeas e revelaram que a espécie Holtzmann apresenta maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença enquanto que a espécie Buffalo foi a menos susceptível. Esta comparação foi realizada dentre as espécies Sprague-Dawley, Holtzmann, Charles River e Buffalo (SWINGLE *et al.*, 1969).

Banik *et al.* (2002) compararam a suscetibilidade para a artrite por adjuvante entre as raças Lewis, Wistar e Sprague-Dawley e constataram que os animais da raça Lewis desenvolvem os sinais artríticos mais precocemente e com maior severidade que os animais das demais espécies, seguido dos animais da raça Wistar e finalmente pelos Sprague-Dawley.

Estudos de Wauben *et al.* (1994) demonstraram que não há diferenças significativas na suscetibilidade ao desenvolvimento de artrite por adjuvante quando comparados ratos machos e fêmeas. Por outro lado, estudos mais recentes (COOK e MOORE, 2006) revelam diferenças no comportamento nociceptivo entre machos e fêmeas submetidos à indução de artrite por CFA. Cai *et al.* (2002) observaram que machos da raça Sprague-Dawley desenvolveram uma artrite mais severa, tanto em relação ao escore artrítico quanto ao desenvolvimento de edema de pata.

Em relação à idade, as diferenças são em relação à indução de artrite. Ratos jovens, de até 7 dias de nascimento, não são considerados suscetíveis à doença, apenas animais com mais de 21 dias de vida. Por outro lado, animais mais velhos (com 9 meses ou mais), foram considerados relativamente resistentes ao desenvolvimento da artrite por adjuvante (GLENN; GRAY, 1965). A idade cuja susceptibilidade é maior parece ser o período entre 6 e 12 semanas após o nascimento dos animais (WAUBEN, 1994).

A justificativa para o uso do modelo de artrite induzida por adjuvante em animais reside na semelhança que este modelo apresenta com a doença reumatóide em humanos (BILLIAU; MATTHYS, 2001; CAI *et al.*, 2006; COOK; MOORE, 2005; NAGAKURA *et al.*, 2003; PEARSON, 1956; TAUROG *et al.*, 1988, WHITEHOUSE, 2007; YU *et al.*, 2002). Tais semelhanças incluem as mudanças histopatológicas, a infiltração celular, a hipersensibilidade e o edema da articulação afetada (DONALDSON *et al.*, 1993; WILSON, *et al.*, 2006.). O modelo de artrite induzida por adjuvante permite o estudo da etiopatogenia da artrite autoimune, o prognóstico da doença e possibilita a o estudo da efetividade do tratamento (WHITEHOUSE, 2007).

2.2.2 INDUÇÃO DA DOENÇA

A doença é induzida com a micobactéria, morta, em óleo adjuvante, que consiste em óleo de parafina contendo monooleato de manitol como surfactante (BILLIAU; MATTHYS, 2001). A concentração ideal para causar uma artrite severa, segundo Wauben (1994) é de 10,0 mg/mL e quando 0,1 mL da suspensão é injetado. Para casos menos severos uma concentração da micobactéria de 1,0 mg/mL a 5,0 mg/mL em óleo é adequada (WAUBEN, 1994). Porém, comumente são comercializados por laboratórios especializados nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 5,0 mg/mL, entretanto esta última dificilmente é encontrada. Doses maiores devem ser manipuladas através de técnicas apropriadas. Pesquisa recente realizada por Cai *et.al.* (2006) demonstrou que animais injetados com 100 µL contendo uma suspensão de 500 µg de CFA manipulado desenvolveram sinais artríticos a partir do 9º dia, enquanto que animais injetados com 100 µL contendo 5 mg/mL de CFA comercializado apresentaram sinais artríticos apenas a partir do 18º dia.

2.2.3 VIAS DE IMUNIZAÇÃO

A via preferencial de imunização é a intradérmica, na base da cauda (WAUBEN, 1994). Outra via comumente utilizada é a injeção intracutânea na pata traseira e intra-articular nas articulações tíbio-femural e tíbio-társica (IIGO *et. al.*, 1991). A vantagem, segundo Wauben (1994), para a imunização na cauda, em contraste com a pata, é que todas as quatro patas são utilizadas para avaliar artrite. Esta injeção é dada, geralmente, na região dorsal da base da cauda ou subcutaneamente na terceira porção distal da cauda. Entretanto, geralmente, injeções intraperitoneais, intramusculares e intravenosas de adjuvante não produzem artrite ou produzem menos freqüentemente (WAUBEN, 1994). Na imunização intradérmica, após a injeção, o local de inoculação torna-se necrótico em três a sete dias (WAUBEN, 1994).

A indicação do volume de adjuvante a ser administrado varia entre os autores, pois cada pesquisador padroniza o tipo de indução adequado aos objetivos de suas pesquisas. Nagakura *et. al.* (2003) e Cook e Moore (2006) injetaram 100 µL de CFA, contendo 5,0

mg/mL de *Micobacterium butyricum*, intra-plantar em ratos; Por sua vez, Zhang *et.al.* (1999), injetou 100 µL de CFA, contendo 0,5 mg/mL de *Micobacterium tuberculosis*, intradérmica na base da cauda de ratos; Yu *et.al.* (2002) utilizaram uma única inoculação de 125 µL de CFA, contendo 250 µg de *Micobacterium butyricum*, intra-articular no joelho de ratos; Naeini *et. al.* (2005) injetaram 25 µL de CFA, contendo 135 µg/mL de *Micobacterium butyricum*, intra-articular na articulação tíbio-társica e Zheng *et. al.* (2002) empregaram 100 µL de adjuvante, contendo 10 mg/mL de *Micobacterium tuberculosis*, intradérmico na base da cauda. Buttler *et. al.* (1991) desenvolveu pesquisa semelhante ao presente trabalho e administraram seis injeções de 0.05 mL de CFA contendo 300 mg de *Micobacterium butyricum*. Todos obtiveram uma indução de artrite por adjuvante satisfatória padronizada de acordo com seus propósitos.

2.2.4 CURSO DA DOENÇA

A artrite induzida geralmente surge entre 10 a 12 dias após a estimulação intradérmica de adjuvante na base da cauda, e entra em remissão por volta de 6 a 10 semanas, para este modelo descrito por Carvalho *et.al.* (2002). Após a indução ativa da doença, sua progressão e severidade podem ser quantificadas fisicamente, histologicamente, radiograficamente e por ressonância magnética (WAUBEN, 1994). A severidade pode ser observada na primeira ou segunda semana e cessa nas três semanas subseqüentes. O edema e deformidades podem ser vistas por um longo período, especialmente na articulação do tornozelo, onde geralmente as deformidades são irreversíveis (WAUBEN, 1994).

No exame físico o que se verifica, geralmente, é o edema, pelo volume de pata ou espessura da articulação (geralmente joelho ou tornozelo), e o grau de artrite, pelo grau de eritema, edema periarticular e deformidade. Para avaliar o grau de artrite podem ser utilizados *escores* de 0 a 4 para cada avaliação (TRENTHAN *et.al.*, 1997).

Na análise histológica, articulações com inflamações precoces mostram mudanças, como a dilatação vascular, suave infiltrado de neutrófilos e células mononucleares, hiperplasia precoce de células de revestimento sinovial e tecido de granulação focal. No espaço articular há infiltrado inflamatório. Sinais inflamatórios estão presentes desde o

início da indução, mesmo quando o edema ainda não é evidente na articulação (TERRIER *et.al.*, 1985).

Na artrite por adjuvante severa, há intensa difusão, infiltrado celular inflamatório denso composto por células mononucleares, polimorfonucleares e neutrófilos. A sinóvia e o tecido conectivo subsinovial é marcadamente edematoso com área focal de necrose. A sinóvia edematosa invade o espaço articular. O tecido de granulação reativo, ou *pannus*, estende-se para o tecido periarticular, como também para o osso subcondral, com destruição da cartilagem articular e invasão para o espaço medular do osso (TERRIER *et.al.*, 1985). Na análise histológica de artrite tardia, observa-se o *pannus* estender-se através da superfície da cartilagem articular, resultando em fibroanquilose. Observa-se também remodelamento ósseo e periósteo (WAUBEN, 1994).

Artrite induzida por adjuvante em ratos tem sido um modelo muito utilizado para estudar inflamação (COSTA *et.al.*, 1981; PEARSON, 1956). Entretanto, como a artrite por adjuvante tem remissão espontânea, a possibilidade para utilizar o modelo para intervenções terapêuticas é limitada. Assim que a doença é estabelecida, a imunoregulação é ativada como parte da resposta fisiológica do anfitrião para suprimir a doença. O tempo adequado para adicional manipulação é, conseqüentemente, pequeno. Por outro lado, a natureza insidiosa e agressiva da doença, cuja destruição da articulação é completa e resulta numa anquilose óssea, o restabelecimento articular não é total, e assim, não é muitas vezes ideal para testar e avaliar discretas intervenções terapêuticas (WAUBEN, 1994).

2.3 TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATÓIDE

O diagnóstico precoce e o início imediato ao tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para a prevenção de incapacidade funcional e lesões articulares irreversíveis (LAURINDO *et.al.*, 2002). Ainda não existe cura para a A.R., mas há agentes que temporariamente diminuem os sintomas articulares e a gravidade da destruição articular (CAILLIET, 2001). Desse modo, os objetivos do tratamento, segundo Laurindo *et.al.* (2002), são prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda da funcionalidade, diminuir a dor e assim, melhorar a qualidade de vida do paciente com artrite reumatóide.

O tratamento inicia com a educação do paciente e seus familiares sobre a doença e o tratamento, com seus riscos e benefícios. O paciente deve ser constantemente avaliado, preferencialmente, por uma equipe multidisciplinar. O tratamento farmacológico varia de acordo com o estágio da doença, sua atividade e severidade, devendo o tratamento ser mais rígido, quanto mais severa for a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Para casos leves, reumatologistas comumente prescrevem antiinflamatórios não esteróides (AINE), analgésicos comuns, drogas modificadoras da doença (DMARDS) e fisioterapia. Em alguns casos, o uso de corticosteróides e/ou intra-articular de baixa dose se faz necessário. Em casos avançados da doença, combina-se metotrexato com leflunomida ou com ciclosporina ou sulfalazina, além do uso de analgésicos e/ou antidepressivos tricíclicos, ou até mesmo opióides (LAURINDO *et.al.*, 2002). O tratamento com antiinflamatórios deve ser mantido enquanto se observarem sinais inflamatórios ou o paciente apresentar dores articulares, porém o uso de drogas modificadoras da doença deve ser mantido indefinidamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Em casos avançados, pode haver indicação de um tratamento cirúrgico. Em casos de lesão estrutural, os reumatologistas recomendam, se necessário, diferentes tipos de tratamento cirúrgico, tais como: a sinovectomia (para sinovite persistente por mais de seis meses), correções de tendões, colocação de próteses, artrodese e artroplastia total (CAILLIET, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Os pacientes com artrite reumatóide, segundo o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas publicado pelo Ministério da Saúde em 2002, devem ser orientados a:

participar de grupos de apoio a pacientes artríticos, principalmente aqueles reconhecidos pelo Ministério da Saúde; participar de programas de proteção articular orientados por fisioterapeutas e terapeutas ocupacionais, realizar exercícios, no período entre as crises, orientadas por fisioterapeutas ou educadores físicos; e manter repouso articular durante as crises, realizando aplicação de gelo.

Apesar do aconselhamento sobre o repouso durante as crises, exercícios regulares em pacientes com artrite reumatóide estão sendo encorajados por diversos pesquisadores com o objetivo de prevenir morbidades (ABELL *et.al.*, 2006; BENHAMOU, 2007; CARVALHO *et.al.*, 2000; SHIH *et.al.*, 2006). Contudo, reumatologistas tradicionalmente não recomendam exercícios para pacientes com artrite ou recomendam exercícios limitados sem utilização de pesos e dentro do limite de movimento, devido a conceitos de que o movimento pode agravar a inflamação articular e acelerar os danos à articulação destes pacientes (BENHAMOU, 2007). Cailliet (2001) defende o repouso admitindo que em uma condição inflamatória aguda, o movimento repetitivo deve ser evitado, pois provoca estresse e agrava a inflamação. Por outro lado, Benhamou (2007) afirma que a única resposta positiva do tratamento com repouso é em relação a pacientes com maior atividade da doença. O papel do repouso e do exercício, segundo Laurindo *et.al.* (2002), deve ser enfatizado, reconhecendo-se que a degeneração articular na artrite reumatóide é maior quando o repouso é prolongado.

2.3.1 TRATAMENTO FISIOTERAPÊUTICO DA ARTRITE REUMATÓIDE

“O tratamento fisioterápico da disfunção articular depende da compreensão clara da função mecânica de cada articulação e dos tecidos relacionados a ela.” (CAILLIET, 2001, p.18). A fisioterapia objetiva restabelecer a funcionalidade através de medidas analgésicas e exercícios terapêuticos de fortalecimento e alongamento da musculatura (LAURINDO *et.al.*, 2002). Considerando o potencial incapacitante da artrite reumatóide, o acompanhamento destes pacientes deve ocorrer desde o início da doença.

Na prática fisioterápica, o paciente inicia o tratamento na fase aguda apenas com medidas analgésicas e, após a diminuição dos sintomas de dor e edema inicia-se a fase de

fortalecimento com cuidados na proteção articular. Estes exercícios devem garantir o fortalecimento da musculatura periarticular e um adequado programa de flexibilidade, evitando o excesso de movimento e privilegiando as cargas moderadas. Depois, o paciente passa para a fase de condicionamento físico, que envolve atividade aeróbia, exercícios resistidos, alongamentos e relaxamento (LAURINDO *et. al.*, 2002).

Na reabilitação, o tratamento é focado primariamente nas conseqüências funcionais da doença (VLIELAND, 2003). Em pacientes com disfunções músculo-esqueléticas crônicas, o fisioterapeuta tem a função de monitorar o funcionamento e a performance física, como também educar o paciente em relação aos cuidados diários e encorajá-los a se engajarem em atividades físicas apropriadas. Esta atitude tem o objetivo de reduzir o risco de comorbidades associadas com o sedentarismo, que é freqüente em pessoas com artrite (FRANSEN, 2004).

2.3.2 A ATIVIDADE FÍSICA E EXERCÍCIOS NA ARTRITE REUMATÓIDE

Tradicionalmente, o objetivo mais importante da terapia com exercícios em pacientes com artrite reumatóide era preservar a mobilidade articular e a manutenção de força muscular (VAN DEN ENDE *et.al.*, 1998). Desde 1985, um grande número de estudos tem sido conduzido para a questão dos benefícios da atividade física regular. Com isso, o Colégio Americano de Reumatologia recentemente admitiu no guia de tratamento para pacientes com artrite reumatóide, a implantação de programas de exercícios regulares (BENHAMOU, 2007).

O painel de Ottawa, guia de exercícios terapêuticos para o tratamento da artrite reumatóide, afirma que boas evidências existem em relação à inclusão de exercícios terapêuticos no tratamento destes pacientes, incluindo exercícios de fortalecimento funcionais específicos e de fortalecimento de todo o corpo. Os benefícios podem variar, dependendo da agudicidade e o tempo de duração da doença. Esses benefícios são a diminuição da dor, aumento da força de preensão manual e melhora do *status* funcional. Porém, segundo este painel, na presença da doença inflamatória, programas de exercícios de baixa intensidade favorecem a redução da dor e uma melhora da funcionalidade quando comparados a programas de exercícios de alta intensidade, os quais podem exacerbar o

processo inflamatório e o risco de danos às articulações afetadas (OTTAWA PANEL, 2004).

A atividade física é uma das maiores intervenções não-farmacológicas para tratar artrite e é considerada um indicador de Saúde do *Health People 2010*, conferência realizada nos Estados Unidos em 2000. Esta conferência teve como objetivo a promoção de saúde, prevenção de doenças e incapacidades e a redução do número de mortes prematuras. Recomendações foram listadas com relação à atividade física nesta conferência, entre elas: 1) Reduzir a proporção de adultos que não se engajam em atividade física; 2) Aumentar a proporção de adultos que se engajam regularmente, de preferência diariamente, em moderada atividade física por até 30 minutos por dia; 3) Aumentar a proporção de adultos que se engajam em atividade física vigorosa que promove o desenvolvimento e manutenção da atividade cardiorrespiratória, três ou mais dias por semana com duração de 20 ou mais minutos por dia; 4) Aumentar a proporção de adultos que realizam atividade física que incrementa ou mantém a força e a resistência muscular (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2000). Dois anos depois, em 2002, foi realizada uma conferência sobre atividade física e artrite, patrocinada pelo Centro de Reabilitação e Pesquisa do Missouri, Colégio Americano de Reumatologia e pela Associação de Profissionais de Saúde de Reumatologia dos Estados Unidos. Neste encontro, foi desenvolvido o Painel Especialista em Artrite e Atividade física, o qual recomenda que indivíduos com artrite devem realizar, com segurança, 30 minutos de atividade física com intensidade moderada (ou seja, 50-70 % da frequência cardíaca máxima), de no mínimo três vezes na semana (SHIH *et.al.*, 2006; WORK GROUP RECOMMENDATIONS, 2003).

A atividade física regular está associada com baixas proporções de morte de adultos em qualquer idade, sempre que apenas níveis moderados de atividade física são realizados (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002). O exercício ajuda a regular a pressão sanguínea, aumenta força muscular e óssea, aumenta a massa magra e diminui a massa gorda, melhora o bem-estar psicológico, reduz o risco de depressão e melhora o humor. Em idosos, a atividade física pode reduzir o risco de quedas e ajudar a manter independência nas atividades da vida diária (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002). Desse modo, a atividade física está associada à melhora da qualidade de vida entre indivíduos com artrite (ABELL *et. al.*, 2005).

Estatísticas demonstram que indivíduos que apresentam incapacidades são menos ativos que indivíduos sadios (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002). Do mesmo modo, uma pesquisa realizada por Shih e colaboradores (2006) afirma que indivíduos com artrite parecem se engajar menos em programas de atividade física que indivíduos sem artrite. Isto se deve em parte a conceitos errôneos sobre o potencial dano às articulações e pelo medo de sentir dor.

Vlieland (2003) e Van Den Ende *et.al.*, (1998) afirmaram através de seus estudos que pacientes com A.R. podem se beneficiar com segurança de atividades físicas. Benhamou (2007) sugere que exercícios de baixa intensidade podem ser realizados com segurança em pacientes com A.R. em qualquer estágio da doença, com um programa individualizado e supervisionado por profissionais qualificados. Esta supervisão é necessária, pois o programa deve ser adequado ao estado de saúde do paciente. Pacientes com a doença reumatóide estável e com pouco acometimento articular podem se adequar a programas de atividade física a serem realizados na comunidade, desde que seja supervisionado periodicamente.

A natureza crônica da doença reumatóide leva a períodos de inatividade, que resulta em redução da força, da resistência muscular e da capacidade aeróbia. A diminuição da resistência muscular se dá pela hipotrofia dos músculos e tecidos periarticulares. A presença constante de dor e inflamação gera a inibição reflexa da contração muscular. Outro sintoma comum em pacientes com artrite é a fadiga muscular. Em geral, a capacidade vascular de pessoas com artrite reumatóide é em média 40 % inferior à de indivíduos sadios (CARVALHO *et.al.*, 2000). Segundo Shih *et.al.* (2006), a falta de atividade física pode contribuir para o descondicionamento, prejuízo funcional, déficit de saúde mental, aumentar o risco de obesidade, além de estes indivíduos terem mais gastos médicos que pessoas ativas. Outro sintoma associado à falta de atividade física é a presença frequente de ansiedade e depressão (SHIH *et.al.*, 2006). Indivíduos com artrite, principalmente mulheres possuem alta prevalência de depressão e ansiedade (DICKENS *et.al.*, 2002). Lin *et.al.* (2003) em suas pesquisas constataram que cuidados com a depressão em indivíduos com artrite têm melhorado a dor, a funcionalidade e a qualidade de vida destes pacientes. Do mesmo modo, praticantes de atividades físicas apresentam menor probabilidade de desenvolverem problemas de saúde física e mental quando

comparados a indivíduos inativos, e isso é significativo tanto entre indivíduos com artrite quanto sem artrite (ABELL *et. al.*, 2005).

Mudanças fisiológicas nas concentrações de opióides no plasma são encontradas após a atividade física (OTTAWA PANEL, 2004). O exercício físico causa a liberação de β -endorfinas (EKDHAL *et.al.*, 1990) e ainda, segundo FIEDMANN (1996), é uma modalidade que deve ser utilizada no tratamento de dor dos pacientes com A.R., trazendo benefícios na mobilidade articular. O exercício com carga, quando adequado, produz um estresse ósseo que estimula a absorção de cálcio, contrapondo-se aos efeitos danosos decorrentes da imobilização e de medicamentos como os corticosteróides (CARVALHO *et.al.*, 2000).

Modos de exercícios comumente utilizados para melhorar a capacidade cardiorrespiratória de portadores de artrite reumatóide são o ciclismo, a caminhada, a corrida, a hidroterapia ou exercícios aquáticos e dança aeróbica (VLIELAND, 2003). Na caminhada, utiliza-se um movimento básico automatizado pelo ser humano: a marcha. Os praticantes desta atividade física procuram a manutenção e o aprimoramento da condição básica de saúde. Esta modalidade é classificada como atividade de baixo impacto e apresenta riscos reduzidos do sistema cardiocirculatório. Este esforço físico quando utilizado em baixa intensidade induz a liberação de endorfinas (LIMA, 1998).

Por outro lado, pesquisa semelhante ao presente trabalho foi realizada em ratos por Buttler *et. al.* (1991). Estes autores administraram seis injeções de 0.05 mL de CFA contendo 300 mg de *Micobacterium butyricum* na articulação tibio-társica e submeteram os animais ao nado com frequência de três vezes por semana, aumentados de 5 a 15 minutos, durante 4 semanas. Os autores relataram que com relação ao edema e mobilidade não houve alterações, porém em relação ao limiar de dor em resposta ao teste de pressão da pata houve diminuição quando comparado ao grupo controle.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados na elaboração desta pesquisa, bem como a caracterização dos grupos analisados e as etapas de desenvolvimento do estudo a fim de alcançar os objetivos propostos. A etapa de coleta de dados desta dissertação foi realizada no Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN) do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A etapa de análise dos dados foi realizada no Laboratório de Instrumentação (LABIN) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

3.1 CARACTERÍSTICA DA PESQUISA

O delineamento experimental deste estudo seguiu as orientações citadas por Vieira (1989) sendo caracterizado por experimentos inteiramente ao acaso em que as unidades, neste caso ratos, foram similares entre si. Isso quer dizer que os ratos tinham a mesma espécie, sexo e idade e, considerando-se o peso, este era bastante semelhante entre os indivíduos do mesmo grupo. Além disso, os experimentos tiveram número diferente de unidades para cada grupo variando entre 5 e 6. Todos os experimentos foram conduzidos com grupo teste acompanhados de seus respectivos grupos controle e os parâmetros avaliados, bem como as condições gerais do estudo foram sempre semelhantes para ambos.

3.2 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram realizados utilizando ratos *Wistar*, com idade aproximada de 2 meses e peso variando entre 200 e 250 gramas. Os animais foram criados, até o desmame, pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos, até o uso, no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas cada), dispondo de livre acesso à água e ração. Os animais foram removidos do biotério do LANEN para ambientação pelo menos 1 hora antes de quaisquer procedimentos

experimentais, sendo que os mesmos foram realizados durante o período matutino e vespertino.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, 1983) e previamente aprovado pelo comitê de ética local para uso de animais (CEUA – UFSC, protocolo número 1160066, e CETEA/CAV – UDESC, protocolo número 1.26/06). Todos os esforços foram realizados para minimizar ao máximo o número de animais utilizados neste estudo bem como o seu sofrimento.

Os experimentos do estudo foram realizados em três etapas: (1) na primeira realizou-se a padronização do modelo de artrite induzida por adjuvante completo de *Freund* (CFA). Para isso, foram utilizados 48 ratos *Wistar* sendo 30 fêmeas e 18 machos; (2) após a padronização do modelo, outro grupo de animais (*naive*), 24 fêmeas, foi utilizado para a indução de artrite por CFA e, posteriormente, submetido à atividade física. Nesta fase, o grupo experimental realizou exercício de deambulação forçada de duração de 1 minuto e, para isso, utilizou-se 24 *Wistar* fêmeas; (3) na terceira etapa do estudo, após a indução de artrite por CFA, o grupo experimental realizou exercício de deambulação progressiva e, para isso, foram utilizados 26 ratos *Wistar* fêmeas.

Nestas duas últimas etapas, os animais foram classificados de acordo com a articulação que recebeu a injeção de CFA em grupo tíbio-femural (TF) ou grupo tíbio-társica (TT) e de acordo com a realização da atividade física em E1 ou EP (E1 para exercício de 1 minuto e EP para exercício progressivo) ou não realização do exercício em E0 e E00 (E0 para o grupo controle do grupo E1 e E00 para o grupo controle do grupo EP).

Ainda na terceira etapa, realizou-se um teste para a complementação do estudo, o qual teve como intuito a verificação de uma possível influência da liberação endógena de corticóides durante a realização do exercício. Para isso, utilizou-se 12 ratos *Wistar* fêmeas com artrite induzida por CFA na articulação tíbio - tarsica.

3.2.1 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os animais que apresentaram sinais de necrose no membro que recebeu a injeção de CFA foram eutanasiados e conseqüentemente excluídos da pesquisa. Apenas animais com as características citadas no item 3.2 foram incluídos neste estudo.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 MATERIAIS

Os reagentes, drogas e equipamentos utilizados nas diferentes etapas de execução dos procedimentos experimentais estão listados na Tabela 1.

Tabela 1

Drogas, reagentes e equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.

Drogas
Adjuvante completo de <i>Freund</i> contendo a <i>Mycobacterium butyricum</i> morta (0,5 mg/mL; 10 mL; Difco)
Adjuvante completo de <i>Freund</i> contendo a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> morta (1 mg/mL; 10 mL; Sigma)
Cloral hidratado 15% (Vetec)
Halotano 250 mL, 1:1 v/v, 2 a 4% diluído em oxigênio hospitalar (Cristália)
Orimeten [®] (aminoglutetimida, 250 mg, Laboratório Ciba)
Reagentes
Solução isotônica de cloreto de sódio 0,9 % (Aster)
Éter etílico (éter sulfúrico para análise, 98%, Synth,)
Álcool iodado 1% (Rialcool)
Álcool etílico hidratado 92,8° (INPM)
Solução aquosa de sulfato de lauril 2,5 %
EDTA sal dissódico para análise (Nuclear)
Corantes <i>May-Grünwald</i> e <i>Giemsa</i>
Equipamentos
Termômetro <i>Full Gauge</i> (TI- 02) para controle da temperatura ambiente
Balança eletrônica (BP-15, Filizola) para pesagem dos animais
Instrumentação para dissecação (bisturi, tesouras, pinças)
Paquímetro não-digital para medição do diâmetro articular (precisão de 0,05 mm)
Sapatilhas metálicas para a medição da incapacitação confeccionadas pelo laboratório
Balança eletrônica de precisão (Acculab, V-121, capacidade de 120 g) para a medição do edema de pata.
Aparelho de medição da incapacitação articular construído pelo professor Carlos R. Tonussi/LANEN/UFSC.
Computador para recepção do sinal com software desenvolvido especificamente para análise do TEP.
Lâminas para microscopia ótica.
Pipeta LabMate capacidade 10-100 µL e 2-20 µL.
Microscópio Óptico (StudarLab).
Câmara de <i>Neubauer Bright-Line</i> (Optik Labor)

3.3.2 MÉTODOS

3.3.2.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental é apresentado através de um diagrama em blocos, para visualização das diferentes etapas da pesquisa e melhor compreensão dos procedimentos descritos ao longo deste capítulo.

Na etapa 1, realizou-se a padronização do modelo de artrite por CFA que objetivou definir a espécie de micobactéria morta contida no CFA (se *Mycobacterium butyricum* ou *Mycobacterium tuberculosis*), definir o número de injeções e o intervalo entre as mesmas, determinar o sexo dos animais (se utilizaria machos ou fêmeas), determinar a articulação de indução da monoartrite (se tíbio-femural ou tíbio-társica), bem como conhecer a curva de nocicepção deste modelo (Figura 1).

Após a padronização do modelo de artrite por CFA realizou-se, na etapa 2, o exercício de deambulação forçada com duração de 1 minuto, durante dez dias e em animais com artrite induzida por CFA. Neste momento do estudo, analisou-se o efeito desta atividade física nas variáveis de incapacitação articular, migração de células e edema articular (Figura 2).

Finalmente, na etapa 3, foi realizado o exercício de deambulação progressiva, onde foram acrescentados a cada dia 1 minuto de deambulação forçada, iniciando com 1 minuto e finalizando, no décimo dia, com dez minutos de exercício. Durante os dez dias de atividade física, foram analisadas as variáveis de incapacitação articular, edema articular e migração de leucócitos do líquido sinovial (Figura 3).

Etapas da pesquisa

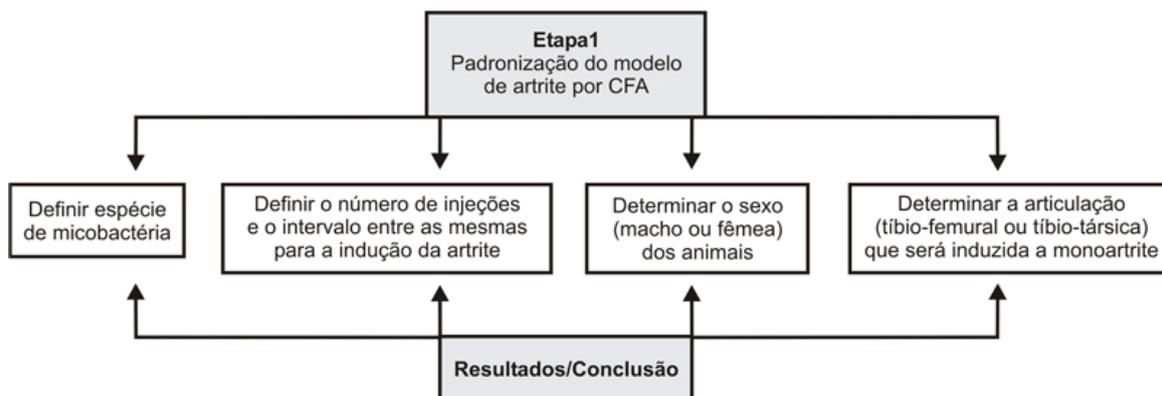


Figura 1. Etapa 1 do estudo: a padronização do modelo de artrite por CFA.

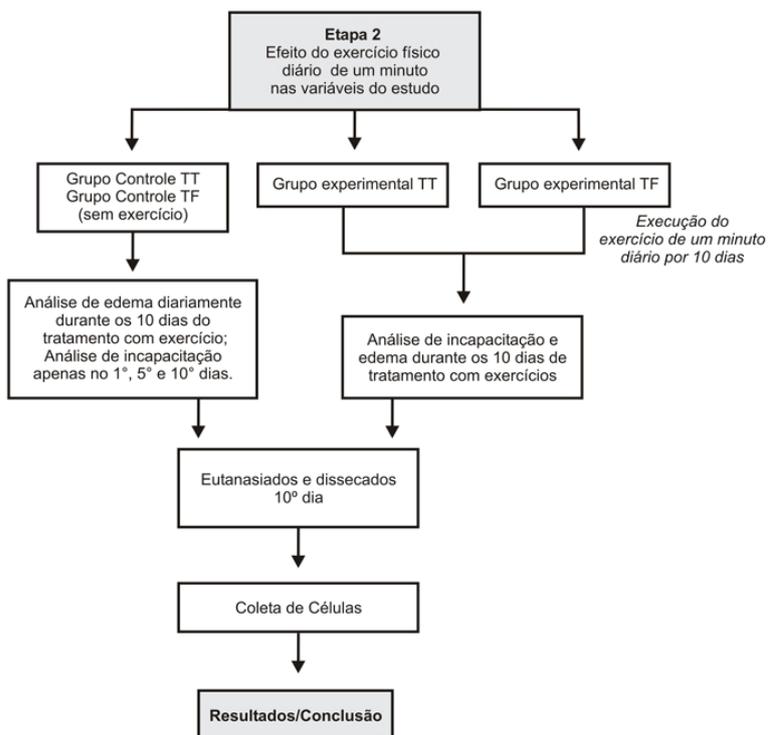


Figura 2. Etapa 2 do estudo: Após indução de artrite por CFA, foi realizado o exercício de 1 minuto diário e realizadas as análises de incapacitação e edema articulares e coleta do líquido sinovial.

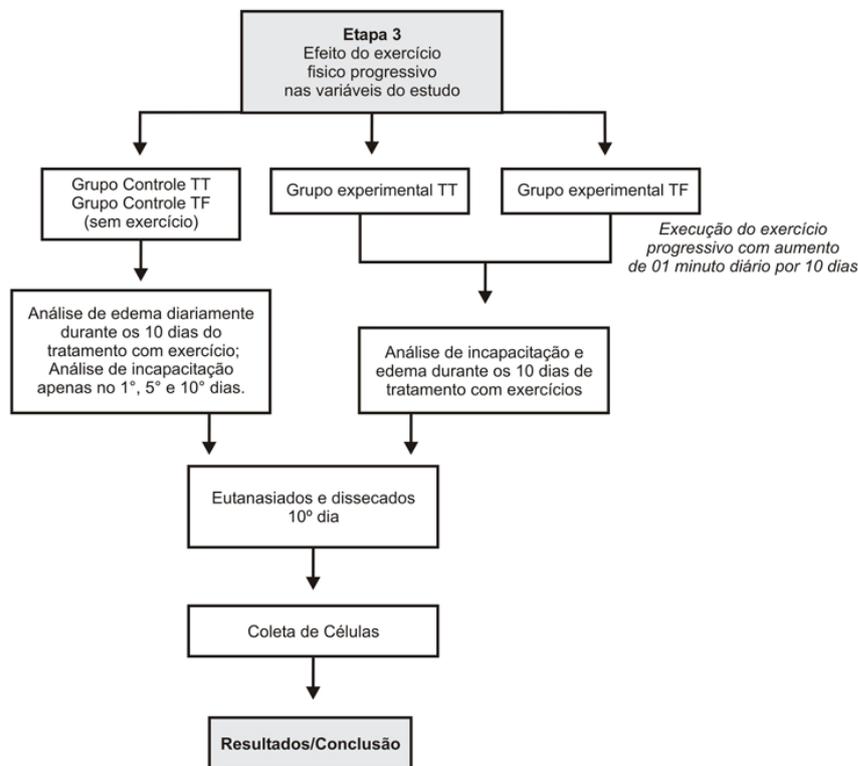


Figura 3. Etapa 3 do estudo: Após indução de artrite por CFA, foi realizado o exercício progressivo e realizadas as análises de incapacitação e edema articulares e coleta do líquido sinovial.

As etapas estão também descritas nas tabelas 2, 3 e 4. A primeira etapa, de padronização do modelo de artrite por CFA, foi realizada através dos 5 experimentos listados na tabela 2, que serão descritos detalhadamente no capítulo de resultados deste estudo.

As etapas 2 e 3, nas quais foram realizados os exercícios de deambulação de 1 minuto e progressivo respectivamente, estão listadas nas tabelas 3 e 4 quanto à classificação dos grupos (grupo experimental ou controle), tamanho da amostra (n) e local de indução da monoartrite (se tíbio-femoral – TF ou tíbio-társica – TT).

Tabela 2

Etapa 1: experimentos realizados para a padronização do modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). M, machos; F, fêmeas; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Mb, *Mycobacterium butyricum*; TF, articulação tíbio-femural; TT, articulação tíbio-társica; BC, base da cauda; SF, solução fisiológica 0,9 %.

Experimentos (exp)	Total de animais	Micobactéria	Local da injeção de CFA	Presença de grupo controle
exp 1	06 M	Mt	1ª e 2ª injeções CFA: TF (intervalo: 8 dias)	não
exp 2	06 M	Mt	1ª injeção CFA: BC 2ª injeção CFA: TF (intervalo: 21 dias)	não
exp 3	06 M	Mt	1ª injeção CFA: BC 2ª injeção CFA: TT (intervalo: 21 dias)	não
exp 4	12 F	Mb	1ª injeção CFA: BC 2ª injeção CFA: TT (intervalo: 21 dias)	sim 1ª injeção: CFA (BC) 2ª injeção: SF (TT)
exp 5	18 F	Mb	1ª injeção CFA: BC 2ª injeção CFA: TF (intervalo: 21 dias)	sim controle 1: 1ª injeção: CFA (BC) e 2ª injeção: SF (TF) controle 2: 1ª injeção: SF (BC) e 2ª injeção: SF (TF)

Tabela 3

Etapa 2: divisão e classificação dos grupos participantes do exercício de 1 minuto após a padronização do modelo de artrite por adjuvante (etapa 1). TF, articulação tíbio-femural; TT, articulação tíbio-társica; E1: grupo que realizou exercício de 1 minuto; E0: grupo que não realizou o exercício de 1 minuto.

Grupos	Classificação	Total de animais no grupo	Prática de exercícios	Local de indução de artrite
TF E1	experimental	06	sim	TF
TF E0	controle	06	não	TF
TT E1	experimental	06	sim	TT
TT E0	controle	06	não	TT

Tabela 4

Etapa 3: divisão e classificação dos grupos participantes do exercício progressivo. TF, articulação tíbio-femural; TT, articulação tíbio-társica; EP: grupo que realizou exercício progressivo; E00: grupo que não realizou o exercício progressivo.

Grupos	Classificação	Total de animais no grupo	Prática de exercícios	Local de indução de artrite
TF EP	experimental	06	sim	TF
TF E00	controle	06	não	TF
TT EP	experimental	06	sim	TT
TTE00	controle	06	não	TT

A finalização da terceira etapa deste estudo ocorreu com a realização de um experimento que objetivou a verificação do efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (inibidor da síntese endógena de corticóides) sobre a ação antinociceptiva e antiedematogênica do exercício no modelo de artrite induzida pelo CFA. Para isso, a aminoglutetimida foi administrada por via oral e na dose de 50 mg/kg durante os 10 dias consecutivos, ou seja, nos mesmos dias em que os animais realizaram o exercício (n=6). O tratamento diário foi efetuado 1 hora antes do exercício. O grupo controle (n=6) recebeu apenas veículo (água destilada, via oral; 0,1 mL/100g).

3.3.2.2 INJEÇÃO INTRADÉRMICA

A injeção intradérmica (i.d.) de CFA foi realizada na base da cauda de animais *naive* previamente anestesiados com halotano (3 %). Para isso, a área que receberia a injeção foi depilada. Após, aplicou-se uma solução de álcool iodado (1 %) para assepsia da região. Em seguida, procedeu-se à injeção de CFA com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm. A agulha foi inserida aproximadamente 1 cm subcutaneamente na base da cauda e, imediatamente após, injetou-se o CFA. Aguardou-se 10 segundos antes de retirar a agulha para evitar efluxo do líquido injetado. Este procedimento de injeção intradérmica de CFA consistiu no primeiro estímulo artritogênico que os animais receberam, 21 dias antes de uma segunda estimulação realizada por via intra-articular.

3.3.2.3 INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR

A injeção intra-articular (i.art.) de CFA foi realizada na articulação tíbio-femural (na região do ligamento suprapatelar) ou tíbio-társica (na região lateral posterior direita) dos animais, 21 dias após a injeção intradérmica de CFA. Para isso, os animais foram previamente anestesiados com halotano (3 %), a área que recebeu a injeção foi depilada e uma solução de álcool iodado (1 %) foi aplicada. Em seguida, procedeu-se à injeção de CFA com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm. Aguardou-se 10 segundos antes de retirar a agulha para evitar efluxo do líquido injetado. Este procedimento de injeção de CFA consistiu no segundo estímulo artritogênico que os animais receberam, 21 dias após a primeira estimulação realizada por via intradérmica.

3.3.2.4 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)

O modelo de artrite induzida por CFA foi escolhido por se tratar de um modelo que reproduz sinais e sintomas semelhantes aos que são observados na artrite reumatóide em humanos. Foram realizados cinco experimentos em 2006 (março a dezembro) com o objetivo de padronizar qual a espécie de micobactéria morta a ser utilizada, o local do primeiro e segundo estímulos com CFA, o sexo dos animais, os intervalos de tempo entre os estímulos e permitir o conhecimento das curvas de incapacitação e edema articulares. A indução da artrite foi realizada através de uma injeção inicial de 50 µL de CFA na base da cauda de cada animal. Após 21 dias, os animais receberam uma segunda injeção de CFA (50 µL) na articulação do joelho (TF) ou tornozelo (TT) direito. Para a padronização do modelo, foram utilizados 18 ratos *Wistar* machos e 30 fêmeas. Também se utilizaram dois tipos distintos de adjuvante completo de *Freund*, um contendo a *Mycobacterium butyricum* (Mb) e outro contendo a *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) mortas. Os experimentos realizados para a padronização do modelo serão descritos detalhadamente no capítulo de Resultados deste estudo.

Após a realização destes experimentos e constatação do protocolo de indução que atenderia os objetivos de induzir uma artrite crônica que perduraria por um período em que fosse possível a realização de um tratamento com exercícios, padronizou-se o modelo. Concluiu-se que seriam utilizados ratos Wistar fêmeas, devido a maior disponibilidade no biotério central, realizando duas injeções de CFA contendo *Mycobacterium butyricum* (0,5 mg/mL; 50 µL) morta, onde a primeira injeção seria intradérmica na base da cauda e, após 21 dias, os animais receberam uma segunda injeção de CFA na articulação tíbio-femural ou tíbio-társica. Optou-se por realizar a monoartrite tanto no tornozelo quanto no joelho em grupos distintos, pois os mesmos atenderam aos objetivos de uma artrite crônica que perdurou por mais de dez dias.

3.3.2.5 PROTOCOLOS DE ATIVIDADE FÍSICA

A atividade física consistiu na deambulação forçada dos animais, a qual foi realizada no mesmo aparato utilizado para o teste de incapacitação articular (cilindro de aço inox, 30 cm de largura, 30 cm de diâmetro e velocidade de rotação de 3 r.p.m). A velocidade de rotação do cilindro para a realização dos exercícios foi definida como sendo a mesma utilizada para a análise do tempo de elevação da pata proposta por Tonussi e Ferreira (1992). A superfície do cilindro é dividida em três trilhos iguais, de modo que permitiu que até três animais realizassem a atividade física simultaneamente. Previamente à realização do segundo estímulo com CFA (24 horas antes), os animais foram treinados quanto à deambulação no cilindro a fim de realizarem de maneira correta a atividade física. Os exercícios iniciaram 24 horas após a segunda injeção de CFA e perduraram por 10 dias consecutivos. Realizou-se primeiramente o exercício de 1 minuto (2º etapa) e após finalizado iniciou-se o exercício progressivo (3º etapa).

Os grupos que participaram do protocolo de exercícios, segunda e terceira etapas do estudo, foram subdivididos em: (a) animais que realizaram o exercício de 1 minuto diário durante um período de 10 dias consecutivos (E1); (b) animais que não realizaram exercício de 1 minuto (E0); (c) animais que realizaram o exercício progressivo (EP) e (d) animais que não realizaram exercício progressivo (E00). Na segunda etapa deste estudo, a atividade física consistiu na deambulação de 1 minuto diariamente desde o primeiro dia após a segunda injeção de CFA. Durante dez dias, foram realizadas as avaliações da incapacitação

e edema articulares diariamente. No décimo dia de avaliação, os animais foram eutanasiados para posterior coleta do fluido sinovial. Na terceira etapa, a atividade física realizada foi o exercício de deambulação progressiva, onde os animais iniciaram no primeiro dia com 1 minuto de deambulação forçada e a cada dia foi acrescido 1 minuto de exercício totalizando no final de dez dias de avaliação, da incapacitação e edema articulares, 10 minutos de atividade física. Realizou-se, também, a eutanásia e a coleta do fluido sinovial no décimo dia.

Estes protocolos foram determinados por experimentos preliminares. Os grupos foram classificados conforme o local de injeção em: TT (tíbio-társica) ou TF (tíbio-femural). Cada grupo experimental foi formado por 6 animais identificados conforme descrito no parágrafo anterior: E1, E0, EP e E00. A atividade física foi realizada após cada medida diária do tempo de elevação da pata no LANEN (do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina).

3.3.2.6 AVALIAÇÃO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

A incapacitação articular foi mensurada através do tempo de elevação da pata (TEP) direita dos animais, em segundos, com o auxílio do sistema de registro proposto por Tonussi e Ferreira (1992), o qual permite avaliar a nocicepção declarada pelos animais. Neste sistema de registro, os animais são submetidos à deambulação forçada em um cilindro de aço inox (30 cm de largura e 30 cm de diâmetro) em rotação contínua a uma velocidade constante de 3 r.p.m. e por um período de 60 segundos. Sapatilhas metálicas são ajustadas nas patas traseiras, sendo que, apenas a sapatilha da pata direita é conectada a um computador que registra o tempo total que esta pata fica sem tocar a superfície do cilindro no período de 60 segundos. O TEP de animais *naïve*, ou seja, sem nenhum tratamento intra-articular é de aproximadamente 10 segundos. O aumento do TEP após a injeção intra-articular de agentes flogísticos indica desenvolvimento de incapacitação articular (TONUSSI; FERREIRA, 1992).

O registro do TEP basal, medida do membro ipsilateral antes da indução da artrite, foi realizado imediatamente antes da segunda injeção de CFA. As medidas do TEP após a indução da artrite foram realizadas diariamente durante 10 dias. As sapatilhas foram

acopladas às patas dos animais por um período mínimo de 1 hora antes da realização dos registros para habituação com as mesmas. A atividade física foi realizada imediatamente após o registro do TEP. Os animais que não realizaram exercício foram colocados, com as sapatilhas nas patas, no cilindro de registro em repouso por 1 minuto para simular as mesmas condições às quais foram expostos os animais que realizaram exercício. O registro do TEP dos animais controle correspondente ao grupo de animais que fizeram exercício de 1 minuto e progressivo foi realizado apenas no primeiro, quinto e décimo dias após a injeção de CFA. Este procedimento foi adotado, pois a deambulação à qual os animais são submetidos para a medida do TEP constitui o próprio exercício físico de 1 minuto. A figura 4A demonstra a sapatilha metálica acoplada à pata do rato e a figura 4B, o aparelho de registro do TEP e os animais realizando a deambulação.

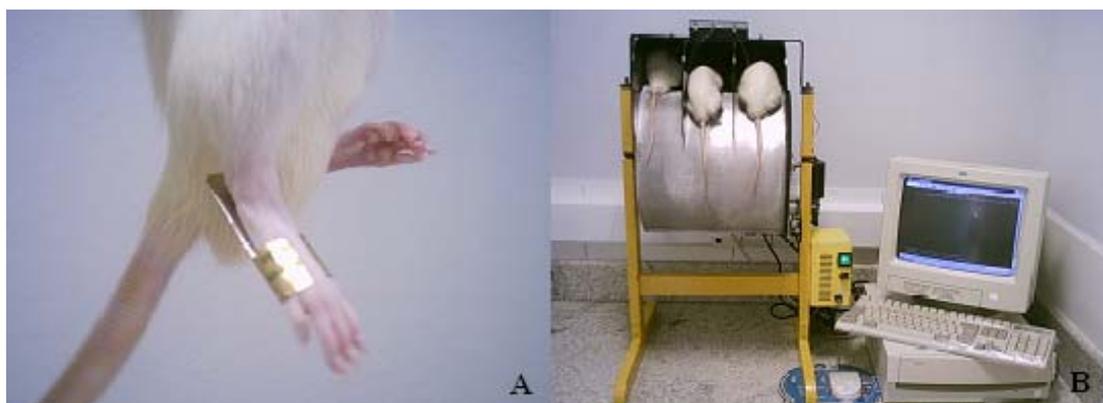


Figura 4. (A) sapatilhas metálicas acopladas na pata traseira do rato; (B) aparelho para deambulação forçada (esquerda) e sistema de registro da incapacitação articular (direita).

3.3.2.7 AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR

A avaliação do edema da articulação tíbio-femural foi realizada com o auxílio de um paquímetro não digital. Registrou-se a variação do diâmetro articular (DA, cm). Para isso, os animais foram imobilizados, dentro de um cone de polietileno, para fins de que fosse possível o acesso apenas ao joelho para obtenção da medida. Já a avaliação do edema de pata ou edema da articulação tíbio-társica foi realizada com o auxílio de uma cubeta

plástica preenchida com sulfato de lauril em água (2,5 %) e acoplada a uma balança eletrônica de precisão (Acculab, V-121). Para este procedimento o animal foi contido com auxílio de um cone de polietileno e a pata foi submersa até imediatamente acima da articulação tíbio-társica. Registrou-se o deslocamento da coluna líquida dentro da cubeta, em mililitros. Cada 1 grama de peso da pata corresponde a 1 mL de líquido deslocado na cubeta. Logo, a grandeza de medida utilizada para representar o edema da articulação tíbio-társica foi o volume em mililitros (EA, mL). Para garantir que as medidas fossem feitas exatamente no mesmo ponto da articulação realizou-se uma marcação diária com caneta a prova d'água. A medida do edema foi realizada após a cada mensuração do TEP ou da realização do exercício físico. A figura 5A demonstra a medida do diâmetro articular da articulação tíbio-femural com auxílio de um paquímetro e a figura 5B, a medida do edema de pata com auxílio da cubeta acoplada à balança de precisão.

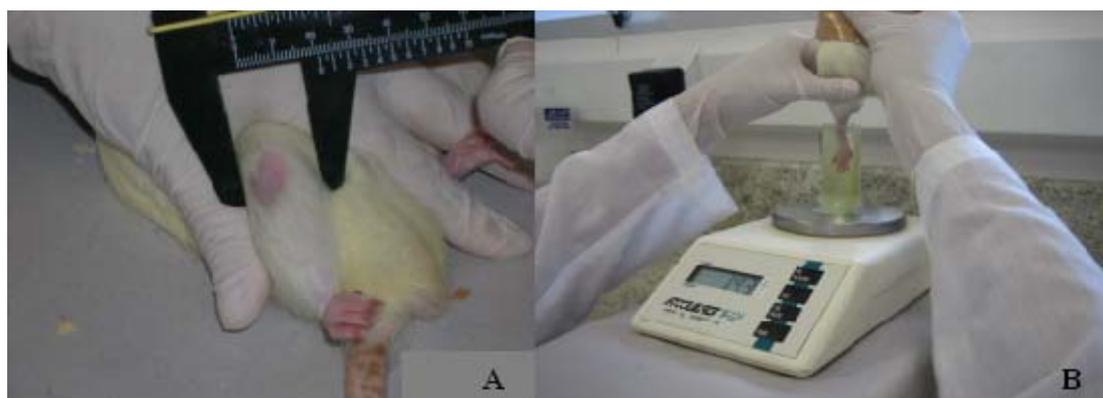


Figura 5. Edema articular das articulações tíbio-femural e tíbio-társica. A) Medida do diâmetro da articulação tíbio-femural; B) Medida do edema de pata da articulação tíbio-társica.

3.3.2.8 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após o término dos protocolos experimentais os animais foram eutanasiados para posterior coleta de células do fluido sinovial. A eutanásia foi realizada através da injeção

intra-peritoneal de hidrato de cloral (15 %; 3 mL/animal), seguido de deslocamento cervical, para certificar-se do óbito dos animais.

3.3.2.9 LEUCOGRAMA DO FLUIDO SINOVIAL

O leucograma do fluido sinovial foi realizado com o objetivo de avaliar quantitativamente a migração de leucócitos para o fluido sinovial tanto da articulação tíbio-társica quanto tíbio-femural. Este procedimento foi realizado no décimo dia após a segunda injeção de CFA e após as medidas do TEP, edema e realização do exercício físico. Após eutanásia dos animais, a cápsula articular foi exposta para a coleta de 5 μ L de fluido sinovial e confecção de um esfregaço em lâmina de vidro. Confeccionou-se um esfregaço do fluido sinovial coletado de cada animal o qual foi, posteriormente, corado com os corantes *May-Grünwald* e *Giemsa* e utilizado para a contagem diferencial de leucócitos (MON, mononucleares; PMN, polimorfonucleares) em microscópio óptico (com aumento de 100x). Imediatamente após a coleta do fluido sinovial puro, foi realizada uma lavagem da cavidade articular com 100 μ L de solução fisiológica 0,9 % contendo EDTA (5 %). Este lavado foi utilizado para a contagem total de leucócitos com auxílio de uma câmara de *Neubauer* e microscópio óptico (com aumento de 40x).

Os dados foram expressos como contagem total de células por milímetro cúbico de fluido sinovial \pm E.P.M (erro padrão da média) (células totais, CT/mm³). O cálculo da quantidade relativa de MON e PMN foi realizado a partir da contagem total e os dados foram expressos como média relativa de MON ou PMN \pm E.P.M. A figura 6 ilustra leucócitos mononucleares (MON) e polimorfonucleares (PMN) em lâmina confeccionada para a contagem diferencial com auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x).

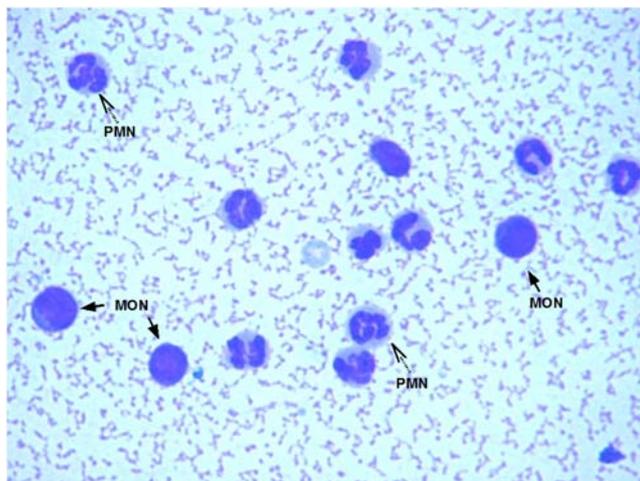


Figura 6: Leucócitos mononucleares (MON) e polimorfonucleares (PMN) em lâmina confeccionada para a contagem diferencial.

3.3.2.10 AVALIAÇÃO DO CORTICÓIDE ENDÓGENO

A avaliação do corticóide endógeno tem como objetivo verificar se o efeito do exercício sobre o processo inflamatório articular pode ser devido ao aumento da liberação de corticóides endógenos. Para isso, utilizou-se aminoglutetimida na concentração de 50 mg/kg, via oral, diluído em água destilada. Preparou-se uma solução de 50 mg/mL e foi administrado 0,1 mL para cada 100 g do peso do animal. Os animais (n=12) com artrite induzida por CFA na articulação tíbio-társica foram submetidos ao exercício progressivo durante dez dias. Seis animais receberam diariamente aminoglutetimida por gavagem, método de administração de fármacos por via oral em animais, e o grupo controle recebeu água (n = 06). Uma hora após a gavagem, os animais foram avaliados quanto à incapacitação articular, edema articular e migração de leucócitos.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e a elaboração dos gráficos foi realizada através dos programas SPSS 14.0 e GraphPad Prism 3.0. Inicialmente verificou-se a distribuição normal dos dados, bem como os cálculos de assimetria e curtose. Os dados da etapa 1, de padronização

do modelo de artrite, foram analisados apenas através de parâmetros de estatística descritiva, tais como a média e o desvio padrão. Os dados de TEP, edema articular e migração de células, das etapas 2 e 3, foram analisados por estatística descritiva como média \pm desvio padrão (ou erro padrão da média – E.P.M.) de seis animais, e para comparação entre os grupos que realizaram exercícios e seus respectivos grupos-controle (não realizaram exercícios) realizaram-se testes de comparação para dados independentes. Para tanto, utilizaram-se os testes *t* de *Student* e U de *Mann Whitney*, quando necessário. Para medidas repetidas utilizou-se o teste *t* de *Student* pareado. Valores de *p* (probabilidade de significância) menores que 0,05 ($p < 0,05$), 0,01 ($p < 0,01$) e 0,001 ($p < 0,001$) foram considerados indicativos de significância.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em três etapas. Na primeira, serão apresentados os dados dos cinco experimentos realizados para cumprir os objetivos da padronização de um modelo de artrite induzida por CFA, sem a qual não seria possível a continuidade das etapas subsequentes. Na segunda e terceira etapas do estudo, onde foram realizados os protocolos de exercícios de 1 minuto e progressivo respectivamente, serão apresentados os dados com relação à incapacitação articular, ao edema articular e à migração de leucócitos para o fluido sinovial. Ainda na etapa 3, para complementação do nosso estudo, será realizado um experimento para avaliar a influência do corticóide endógeno na incapacitação e edema articular durante o exercício progressivo.

4.1 PRIMEIRA ETAPA: PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE ARTRITE POR CFA

Os experimentos realizados para a padronização do modelo de indução de artrite por CFA foram:

(a) Experimento 1 (EXP 1): Seis ratos machos receberam duas injeções de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/mL; 50 µL) na articulação tíbio-femural com um intervalo de 8 dias entre cada injeção. O TEP e DA foram avaliados diariamente durante 29 dias (GRÁFICOS 1 e 2, respectivamente).

A administração intra-articular de CFA promoveu aumento significativo do TEP e DA. A elevação máxima do TEP ocorreu no segundo dia ($27,40 \pm 4,23$ s) e do DA em torno da sexta hora do mesmo dia ($0,44 \pm 0,03$ cm) após a primeira injeção de CFA. Após este período observou-se queda progressiva da incapacitação retornando próxima aos níveis basais por volta do sexto dia para o TEP ($8,83 \pm 0,33$ s). O edema articular diminuiu em torno do sétimo dia para o DA ($0,25 \pm 0,03$ cm), mas não havia ainda retornado aos níveis basais, porém demonstrando uma tendência a diminuir. Por este motivo optou-se por realizar duas injeções de CFA com um intervalo de oito dias. O objetivo seria obter TEP e DA elevados e que perdurassem por um período mais longo, superior a 10 dias.

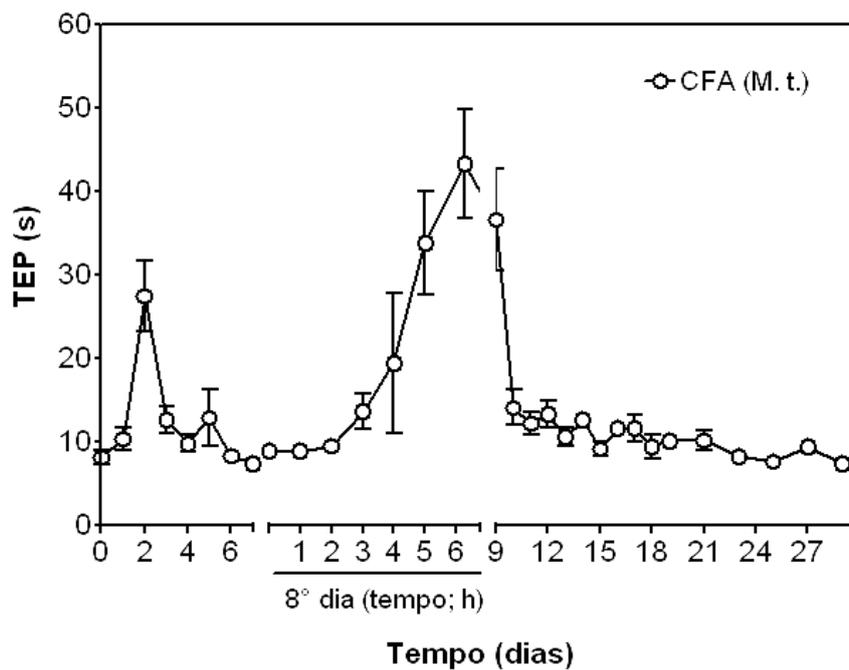


GRÁFICO 1 - (EXP 1) Efeito de duas administrações intra-articulares (0 e 8º dia) na TF, com 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na incapacitação articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média).

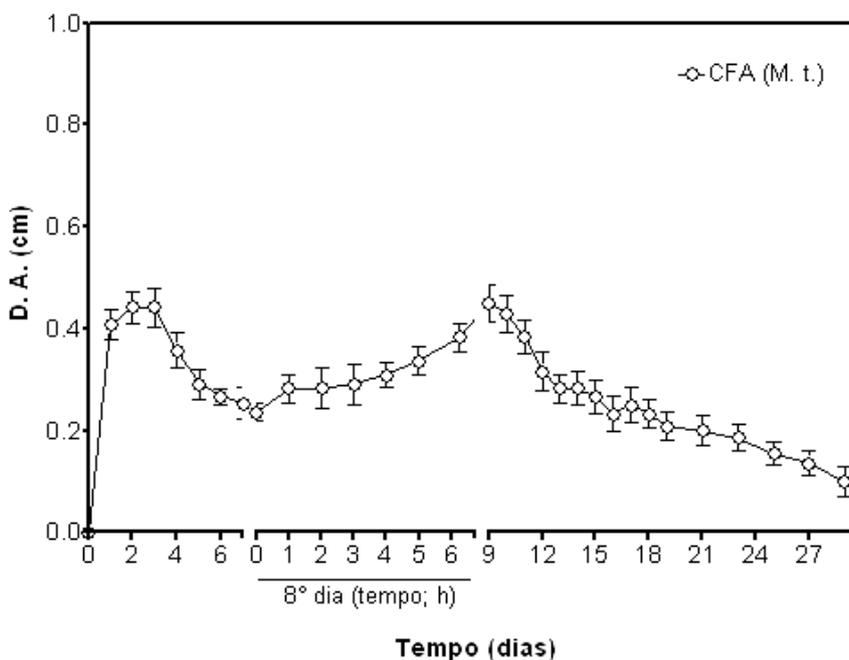


GRÁFICO 2 - (EXP 1) Efeito de duas administrações intra-articulares (0 e 8º dia) na TF, com 50 µL (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, no diâmetro articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média).

O segundo estímulo com CFA promoveu aumento significativo do TEP máximo na sexta hora após o segundo estímulo ($43,30 \pm 6,58$ s) e do DA máximo 24 horas após o segundo estímulo ($0,45 \pm 0,03$ cm). A elevação do TEP perdurou até o 15º dia ($9,26 \pm 0,88$ s), não atingindo, assim, o objetivo de duração por dez dias. O DA perdurou até o 29º dia ($0,10 \pm 0,02$ cm) após a reestimulação.

(b) Experimento 2 (EXP 2): Seis ratos machos receberam uma injeção de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/mL; 50 µL) na base da cauda e outra na articulação tíbio-femural com um intervalo de 21 dias entre cada injeção. O TEP e DA foram avaliados diariamente durante 42 dias após a primeira estimulação (GRÁFICOS 3 e 4).

A segunda estimulação com CFA promoveu aumento progressivo do TEP e DA. A elevação do TEP ocorreu em torno de 24 horas ($42,70 \pm 3,98$ s) e do DA em torno de 48 horas ($0,58 \pm 0,03$ cm) após a aplicação do segundo estímulo de CFA. Após este período observou-se queda progressiva da incapacitação e do edema articulares retornando próximos aos níveis basais em torno do 33º dia para o TEP ($10,98 \pm 0,58$ s) e em torno do 42º dia para o DA ($0,13 \pm 0,01$ cm).

O diferencial entre este experimento e o EXP 1 foi que, neste, tanto o aumento do TEP quanto do DA perdurou por mais tempo após o segundo estímulo com CFA além de apresentar picos com valores maiores que o observado no EXP 1, cumprindo os objetivos estabelecidos quanto a duração do TEP e DA por mais de dez dias. Também é importante salientar que a injeção intradérmica de CFA na base da cauda, por si só não promoveu alteração significativa do TEP e DA durante os 21 dias que antecederam o segundo estímulo.

Desta forma, este experimento definiu que o primeiro estímulo com CFA seria realizado na base da cauda e o segundo na articulação e, o intervalo entre cada estímulo seria de 21 dias.

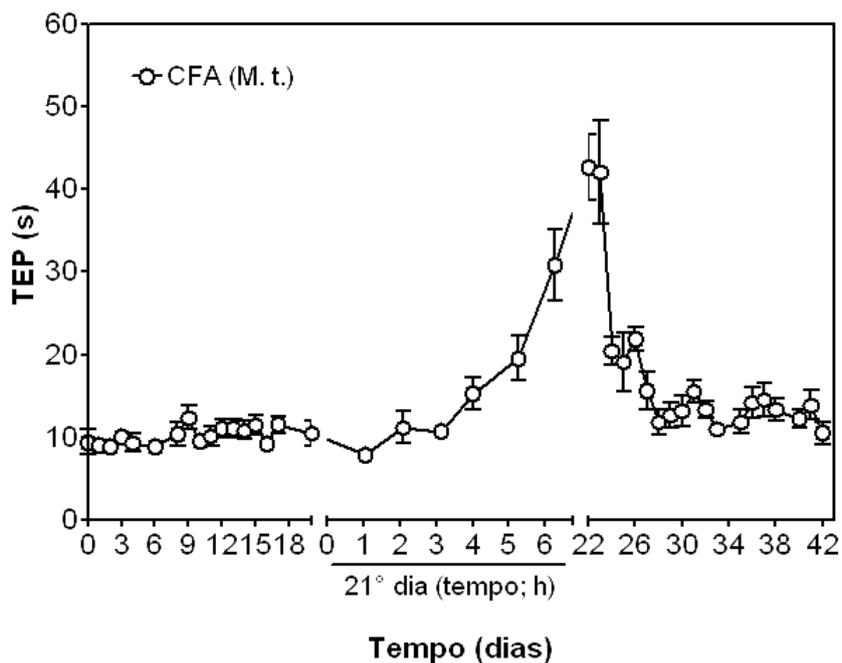


GRÁFICO 3 - (EXP 2) Efeito da administração de 50 μ L (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, o 1º estímulo na base da cauda e o 2º estímulo na articulação TF, na incapacitação articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média).

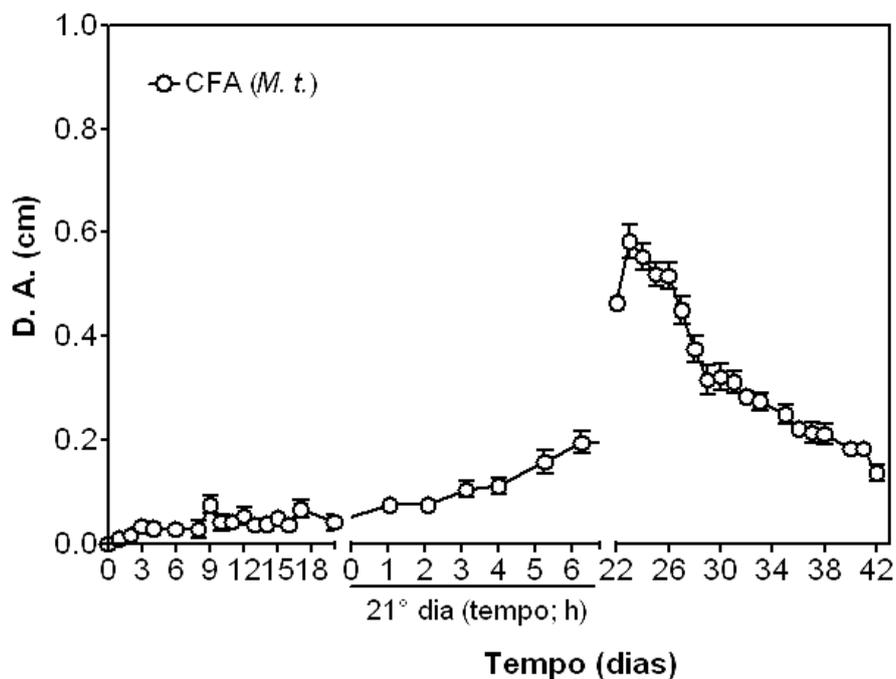


GRÁFICO 4 - (EXP 2) Efeito da administração de 50 μ L (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, o 1º estímulo na base da cauda e o 2º estímulo na articulação TF, no diâmetro articular de ratos machos (n=6). Dados expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média).

(c) **Experimento 3 (EXP 3):** Seis ratos machos receberam uma injeção de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/mL; 50 µL) na base da cauda. Após 21 dias os animais receberam um segundo estímulo de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis* (50 µL) na articulação tíbio-társica. O TEP e edema foram avaliados diariamente durante 21 dias após a segunda estimulação (GRÁFICOS 7 e 8).

A segunda estimulação por CFA na articulação tíbio-társica promoveu aumento progressivo do TEP e do edema. A elevação do TEP iniciou-se em torno da quarta hora ($33,60 \pm 6,84$ s) e do edema em torno da primeira hora ($0,18 \pm 0,06$ mL). Este aumento foi progressivo e atingiu valores máximos em torno do segundo dia após o segundo estímulo (TEP: $35,58 \pm 8,23$ s; Edema: $1,09 \pm 0,13$ mL). Observou-se queda progressiva do TEP e edema a partir do dia quarto dia (TEP: $23,18 \pm 6,98$ s; Edema: $0,89 \pm 0,18$ mL). Ao fim deste experimento o TEP e o edema retornaram próximos aos níveis basais (19º dia após o reestímulo (TEP: $17,4 \pm 1,22$ s; Edema: $1,09 \pm 0,13$ mL).

Por observação visual notou-se edema com aspecto necrótico nos animais e, por este motivo, três dentre os seis animais do grupo foram eutanasiados antes da conclusão do experimento. Sendo assim, pelo fato de o *Mycobacterium tuberculosis* aplicado na articulação tíbio-társica não induzir aumento persistente do TEP e edema decidiu-se abandonar a utilização desta espécie de micobactéria. Portanto, a próxima etapa de padronização do modelo foi realizada utilizando o *Mycobacterium butyricum*.

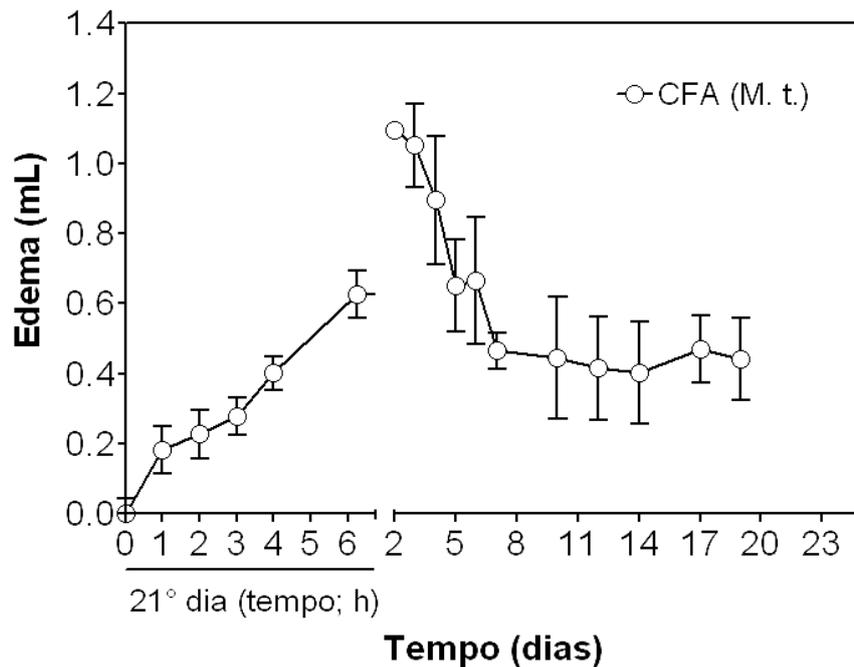


GRÁFICO 5 - (EXP 3) Efeito da administração de 50 μ L (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na base da cauda (1 $^{\circ}$ estímulo) e na articulação TF (2 $^{\circ}$ estímulo), no edema articular de machos (n=6). Dados analisados a partir da reinjeção e expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média).

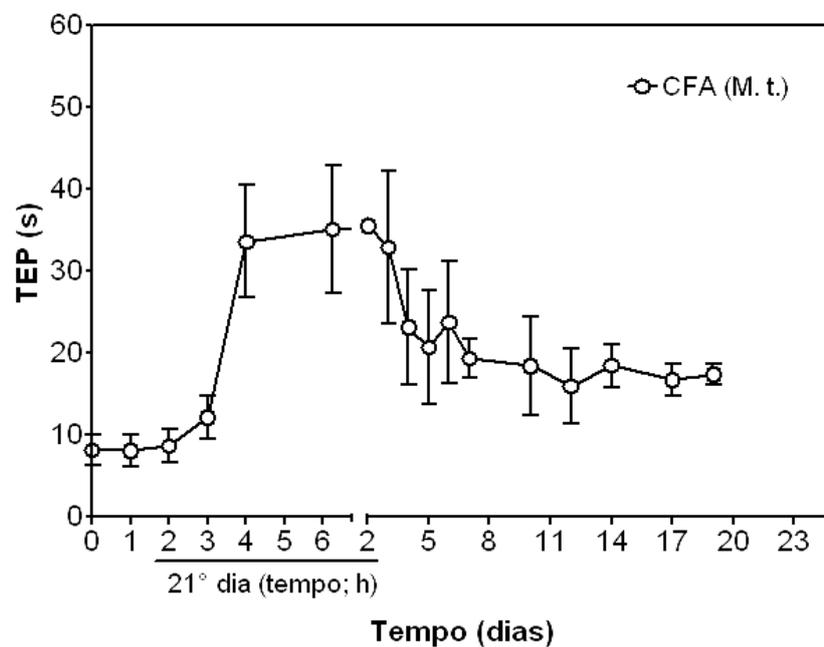


GRÁFICO 6 - (EXP 3) Efeito da administração de 50 μ L (1 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium tuberculosis*, na base da cauda (1 $^{\circ}$ estímulo) e na articulação TF (2 $^{\circ}$ estímulo), na incapacitação articular de machos (n=6). Dados analisados a partir da 2 $^{\circ}$ injeção e expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média).

(d) Experimento 4 (EXP 4): Doze ratos fêmeas receberam uma injeção de CFA contendo *Mycobacterium butyricum* (0,5 mg/mL; 50 µL) na base da cauda. Após 21 dias as ratas foram subdivididas em dois grupos de seis animais cada. Um grupo recebeu um segundo estímulo de CFA contendo *Mycobacterium butyricum* (50 µL), grupo CFA / CFA, e o outro grupo recebeu solução fisiológica (0,9 %; 50 µL), grupo controle, ambos na articulação tíbio-társica (GRÁFICOS 5 e 6).

A segunda estimulação com CFA na articulação tíbio-társica promoveu aumento progressivo do TEP e do edema em relação ao grupo controle. A elevação do TEP iniciou-se em torno da sexta hora (TEP do grupo controle: $13,41 \pm 1,46$ s; TEP do grupo CFA / CFA: $36,76 \pm 5,54$ s) e do edema em torno da primeira hora (Edema do grupo controle: $0,05 \pm 0,03$ mL; Edema do grupo CFA / CFA: $0,20 \pm 0,04$ mL). Este aumento foi progressivo e atingiu valores máximos em torno de 48 horas (TEP do grupo controle: $12,23 \pm 1,11$ s; TEP do grupo CFA / CFA: $54,80 \pm 1,40$ s) assim como o edema (Edema do grupo controle: $-0,06 \pm 0,01$ mL; Edema do grupo CFA / CFA: $1,02 \pm 0,05$ mL) após a segunda injeção de CFA. Após o 24º dia o TEP começou a reduzir chegando aos níveis basais no fim dos 42 dias de avaliação.

Por outro lado, o edema apresentou um platô de elevação entre o primeiro (Edema do grupo controle: $-0,005 \pm 0,010$ mL; Edema do grupo CFA / CFA: $0,91 \pm 0,05$ mL) e o quarto dia (Edema do grupo controle: $-0,15 \pm 0,01$ mL; Edema do grupo CFA / CFA: $0,98 \pm 0,07$ mL) após o segundo estímulo, seguido de uma queda e formação de um segundo platô que durou do 11º (Edema do grupo controle: $0,081 \pm 0,020$ mL; Edema do grupo CFA / CFA: $0,75 \pm 0,07$ mL) ao 18º dia (Edema do grupo controle: $0,080 \pm 0,008$ mL; Edema do grupo CFA / CFA: $0,71 \pm 0,04$ mL). Observou-se uma maior variação do edema no primeiro platô em relação ao segundo. No entanto, mesmo sendo menor a variação do edema no segundo platô, esta foi duradoura e diferente em relação ao grupo controle, não retornando aos níveis basais até o fim do experimento.

Estes resultados demonstram que parte dos objetivos deste estudo foi alcançada, ou seja, obteve-se um protocolo experimental em que o CFA induziu aumento persistente de pelo menos um dos parâmetros avaliados, o edema articular. Porém, testou-se uma espécie diferente de micobactéria. O segundo estímulo com CFA foi numa articulação distinta dos Experimentos 1 e 2 e o sexo dos animais também diferiu neste experimento.

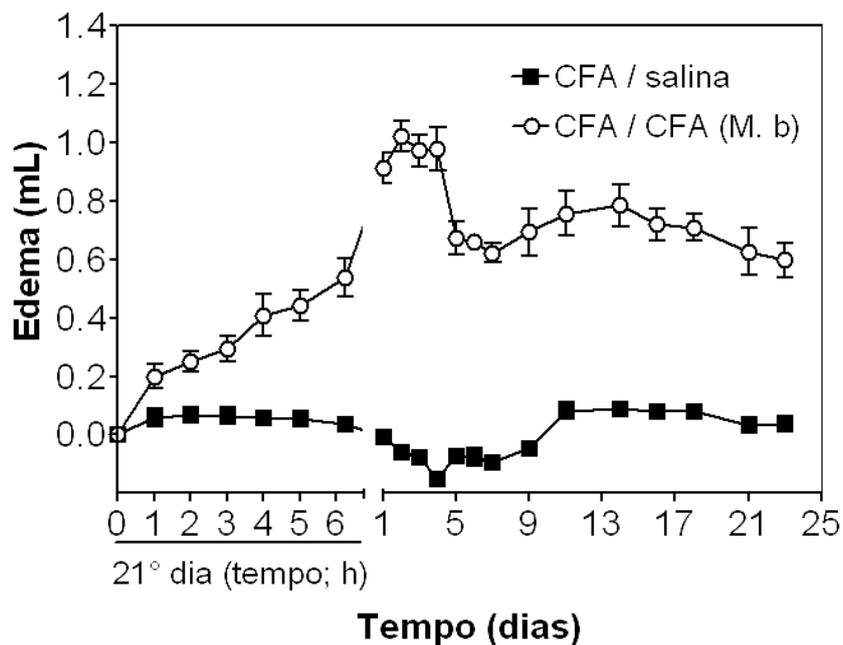


GRÁFICO 7 – (EXP 4): Efeito da administração de 50 μ L (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1º estímulo) e na articulação TT (2º estímulo), no edema articular de fêmeas (n=6; O). O grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1º estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TT (2º estímulo) (n=6; ■). Dados expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média).

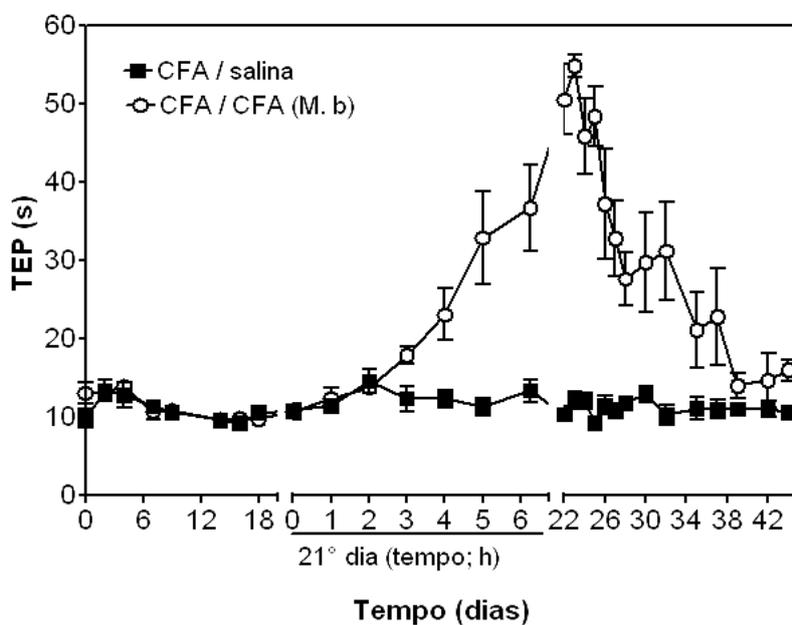


GRÁFICO 8 – (EXP 4): Efeito da administração de 50 μ L (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1º estímulo) e na articulação TT (2º estímulo), na incapacitação articular de fêmeas (n=6; O). O grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1º estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TT (2º estímulo) (n=6; ■). Dados expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média).

Estes resultados sugerem que o *Mycobacterium butyricum* apresenta potencial em induzir nocicepção e edema maior e mais persistente que o *Mycobacterium tuberculosis* mesmo levando em consideração que os experimentos em que se testou o *Mycobacterium tuberculosis* foram realizados em uma articulação distinta. Por observação visual notou-se que houve um dano na estrutura articular no final do experimento com a *Mycobacterium butyricum*, porém não tão severa quanto o dano ocasionado pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, sugere-se que fêmeas podem ser utilizadas neste estudo em substituição aos machos, devido a maior disponibilidade destas no biotério central.

(e) Experimento 5 (EXP 5): Doze ratos fêmeas receberam uma injeção de CFA contendo *Mycobacterium butyricum* (0,5 mg/mL; 50 µL) na base da cauda. Após 21 dias as ratas foram subdivididas em dois grupos de seis animais cada. Um grupo recebeu um segundo estímulo de CFA contendo *Mycobacterium butyricum* (50 µL), grupo CFA / CFA e o outro apenas solução salina (0,9 %; 50 µL), grupo CFA / salina, ambos na articulação tíbio-femural. Utilizou-se um terceiro grupo de animais que recebeu ao invés de dois estímulos de CFA, dois estímulos de solução fisiológica (0,9 %), grupo salina / salina, sendo o primeiro na base da cauda e o segundo na articulação tíbio-femural. O TEP e edema foram avaliados diariamente durante 23 dias após a segunda estimulação (GRÁFICOS 9 e 10).

A segunda injeção de CFA na articulação tíbio-femural promoveu aumento progressivo do TEP e do edema em relação ao grupo CFA / salina. Os resultados do grupo CFA / salina também foram maiores para o TEP e DA em relação ao grupo salina / salina. A elevação do TEP iniciou-se em torno da quinta hora (TEP do grupo salina / salina: $11,93 \pm 1,01$; TEP do grupo CFA/ CFA: $24,15 \pm 2,78$ s; TEP do grupo CFA/ salina: $11,75 \pm 1,70$ s) e, do edema em torno da sexta hora (edema do grupo salina / salina: $0,05 \pm 0,01$ cm; edema do grupo CFA / CFA: $0,24 \pm 0,01$ cm; edema do grupo CFA / salina: $0,08 \pm 0,01$ cm) após a segunda injeção de CFA. Este aumento foi progressivo e atingiu valores máximos em torno de 48 horas (TEP do grupo salina / salina: $12,10 \pm 1,71$ s; TEP do grupo CFA/ CFA: $51,30 \pm 6,22$ s; TEP do grupo CFA/ salina: $11,75 \pm 2,07$ s; edema do grupo salina / salina: $0,07 \pm 0,01$ cm; edema do grupo CFA / CFA: $0,53 \pm 0,04$ cm; edema do grupo CFA / salina: $0,09 \pm 0,02$ cm). Observou-se queda progressiva do TEP a partir do

quarto dia até o final do experimento. O edema obteve uma queda no terceiro dia, porém no dia subsequente aumentou, chegando a um segundo pico no décimo dia (edema do grupo salina / salina: $0,09 \pm 0,01$ cm; edema do grupo CFA / CFA: $0,43 \pm 0,06$ cm; edema do grupo CFA / salina: $0,09 \pm 0,01$ cm), o qual decresceu até o final do experimento, 23 dias após a reestimulação, porém não retornando aos níveis basais.

O grupo que recebeu CFA como primeiro estímulo e solução fisiológica como segundo estímulo, grupo CFA / salina, não apresentou alterações do TEP e do edema demonstrando, assim, o potencial de uma segunda estimulação com CFA contendo *Mycobacterium butyricum* em alterar de maneira duradoura tais parâmetros.

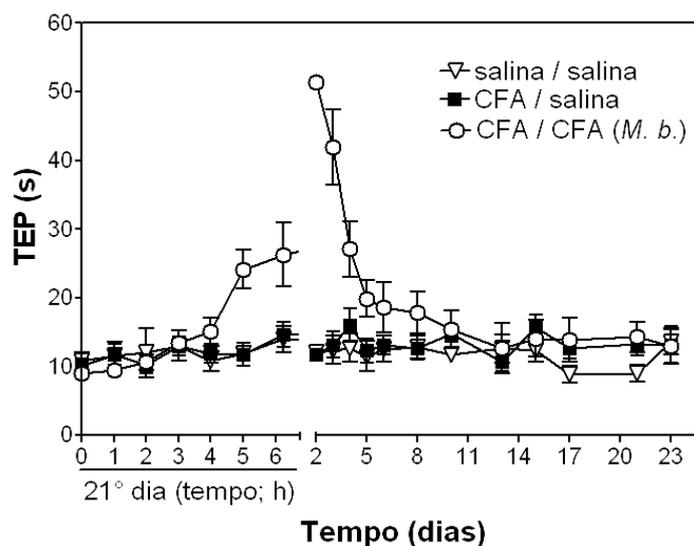


GRÁFICO 9 - EXP 5: Efeito da administração de 50 µL (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1º estímulo) e na articulação TF (2º estímulo), na incapacitação articular de fêmeas, grupo CFA / CFA (n=6; ○). Um grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1º estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TF (2º estímulo), grupo CFA / salina (n=6; ■). Outro controle recebeu os dois estímulos com solução fisiológica (0,9), grupo salina / salina (n=6; ▽). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média).

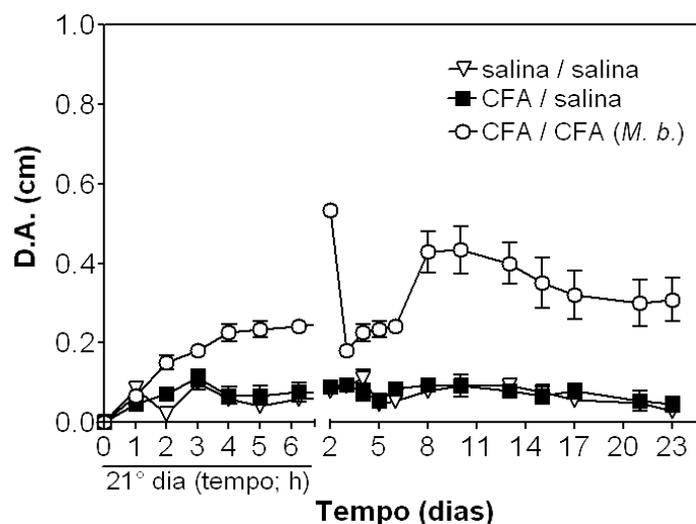


GRÁFICO 10 - EXP 5: Efeito da administração de 50 µL (0,5 mg/mL) de CFA contendo *Mycobacterium butyricum*, na base da cauda (1º estímulo) e na articulação TF (2º estímulo), no diâmetro articular de fêmeas, grupo CFA / CFA (n=6; ○). Um grupo controle recebeu CFA na base da cauda (1º estímulo) e solução fisiológica (0,9%) na articulação TF (2º estímulo), grupo CFA / salina (n=6; ■). Outro controle recebeu os dois estímulos com solução fisiológica (0,9), grupo salina / salina (n=6; ▽). Dados expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média).

4.2 ETAPA 2: PROTOCOLO DE 1 MINUTO DE EXERCÍCIO DIÁRIO

Após a padronização do modelo de artrite por CFA e o conhecimento das curvas de incapacitação e edema articulares dos animais com artrite induzida, passou-se a registrar os dados de IA, DA e EA apenas imediatamente antes do segundo estímulo com CFA (medida basal) e diariamente durante 10 dias. Os dados de DA e EA foram expressos como a diferença entre a medida basal e as medidas tomadas a cada dia durante os 10 dias de avaliação. Os dados de IA foram expressos tal qual foram mensurados, de modo que o “dia zero” corresponde à medida basal e os dias subsequentes correspondem aos dez dias de tratamento por exercícios. A coleta do leucograma do fluido sinovial foi realizada apenas no 10º dia e os dados foram expressos em mononucleares/mm³, polimorfonucleares/mm³ e leucócitos/mm³.

De acordo com os resultados, o exercício de 1 minuto diário promoveu uma diminuição do TEP, mas não significativa para $p \leq 0,05$, observada a partir do quinto dia de avaliação para a articulação tíbio-femural (TEP 5º dia grupo E0: $34,70 \pm 5,41$ s; TEP 5º dia

grupo E1: $26,20 \pm 6,63$ s; TEP 10° dia grupo E0: $20,70 \pm 5,76$; TEP 10° dia grupo E1: $16,89 \pm 3,68$) e tíbio-társica (TEP 5° dia, grupo E0: $35,40 \pm 4,01$ s; TEP 5° dia grupo E1: $28,60 \pm 4,80$ s; TEP 10° dia grupo E0: $28,90 \pm 6,56$ s; TEP 10° dia grupo E1: $17,80 \pm 2,56$ s) (GRÁFICOS 11 e 12). É interessante ressaltar que o E1 realizado desde o 1° dia de artrite não aumentou o TEP, o qual tendeu a reduzir durante os dez dias. O exercício de 1 minuto também promoveu uma redução significativa do DA na articulação tíbio-femural ($p < 0,001$) e do EA na articulação tíbio-társica ($p \leq 0,001$) (GRÁFICOS 13 e 14).

O exercício não produziu alterações estatisticamente significativas na migração de leucócitos na articulação TF (MON grupo E0: $2608,4 \pm 1074,3$ e MON grupo E1: $4053,0 \pm 35,13$ mononucleares/ mm^3 ; PMN grupo E0: $4481,0 \pm 1109,0$ e PMN grupo E1: $3156,6 \pm 1351,7$ polimorfonucleares/ mm^3 ; CT grupo E0: $7090,0 \pm 1103,1$ e CT grupo E1: $7210,0 \pm 2023,2$ leucócitos/ mm^3), porém demonstrou tendência em células MON para $p \leq 0,06$. Entretanto, na articulação TT observou-se que houve diferença entre os grupos E1 e E0 na migração de leucócitos ($p \leq 0,05$; MON grupo E0: $10446,1 \pm 2439,7$ e MON grupo E1: $5386,5 \pm 458,8$ mononucleares/ mm^3 ; $p \leq 0,01$, PMN E0: $15170,3 \pm 2284,3$ e PMN grupo E1: $6462,8 \pm 1694,4$ polimorfonucleares/ mm^3 ; $p \leq 0,01$, CT grupo E0: $25616,6 \pm 4009,5$ e CT grupo E1: $11850,0 \pm 1875,8$ leucócitos/ mm^3) (GRÁFICOS 15 e 16).

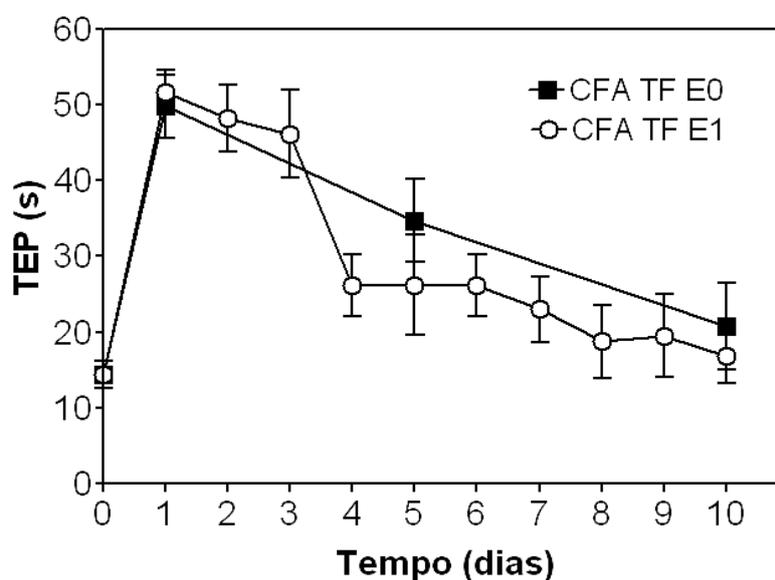


GRÁFICO 11 - Efeito do exercício de 1 minuto na incapacitação articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, $n=6$) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μL). O grupo controle (CFA TF E0; $n=6$) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA ($n=12$). Utilizou-se teste t de Student para $p \leq 0,05$.

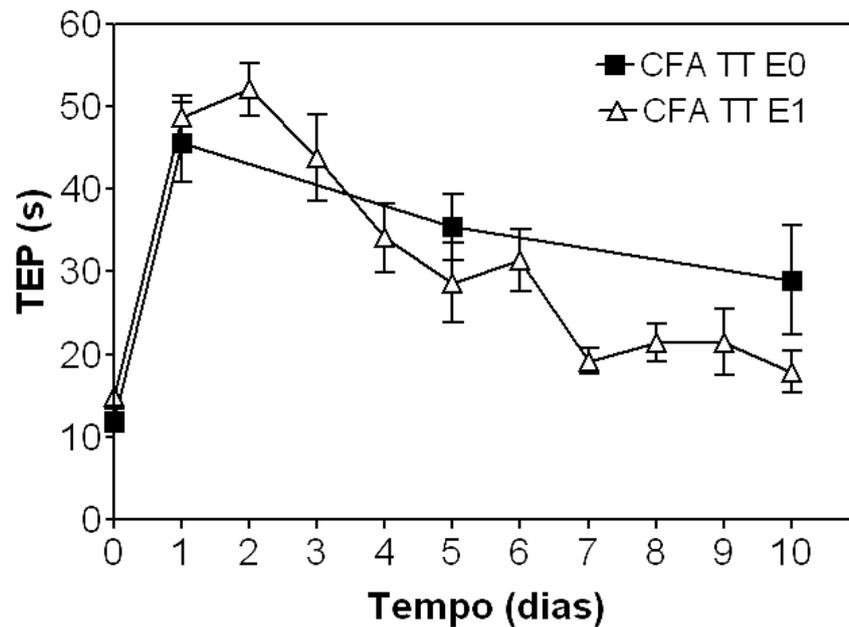


GRÁFICO 12 - Efeito do exercício de 1 minuto na incapacitação articular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *Student* para $p \leq 0,05$.

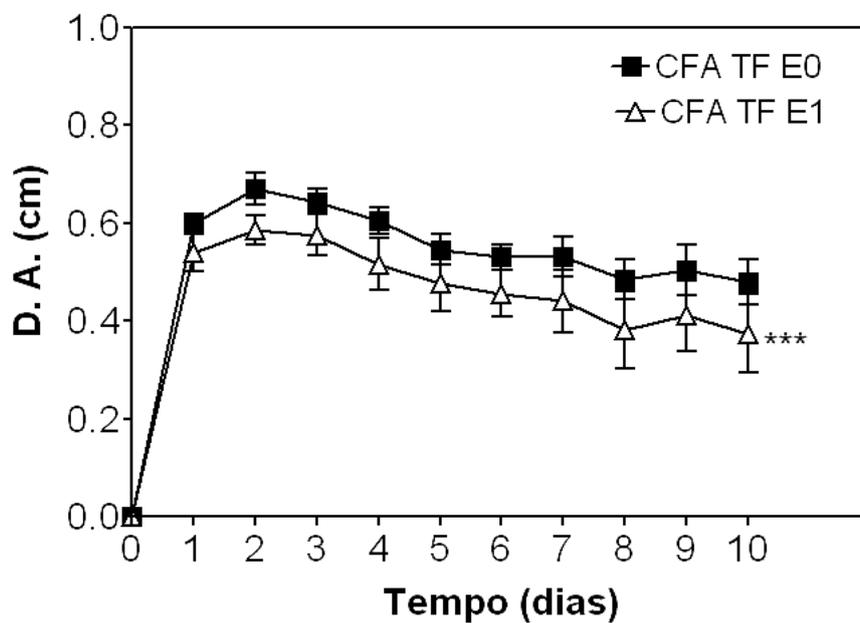


GRÁFICO 13 - Efeito do exercício de 1 minuto no diâmetro articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *Student*, $p \leq 0,001$ (***)

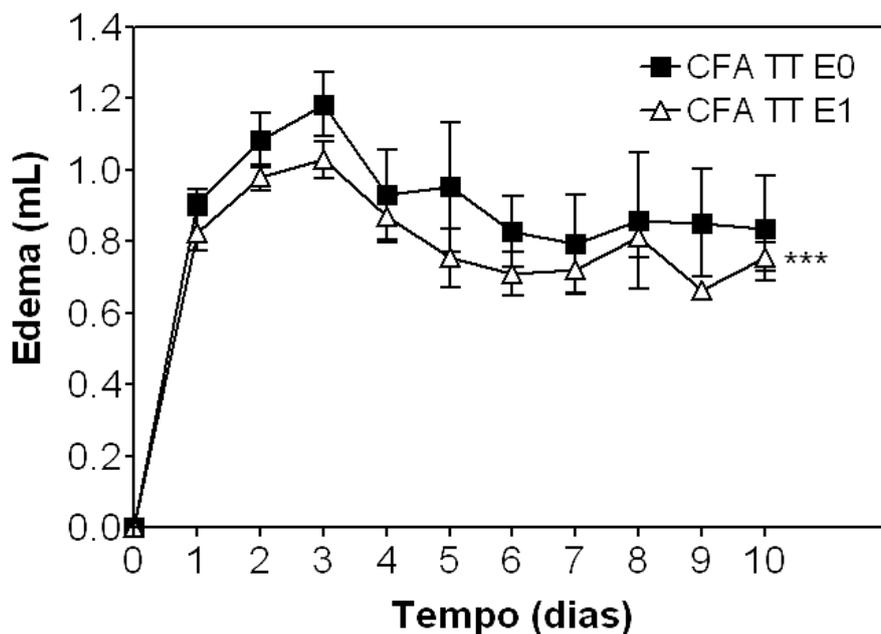


GRÁFICO 14 - Efeito do exercício de 1 minuto no edema de pata da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *Student*, $p \leq 0,001$ (***)

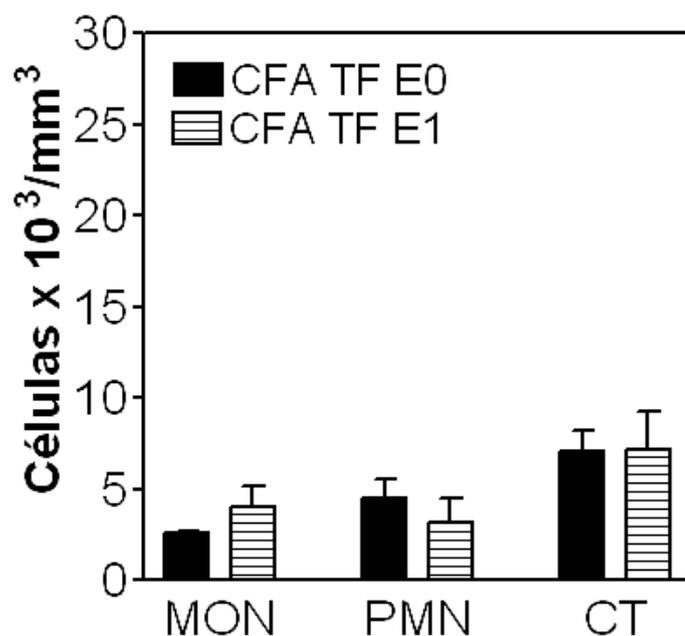


GRÁFICO 15 - Efeito do exercício de 1 minuto diário na migração celular na articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de *Student* para $p \leq 0,05$.

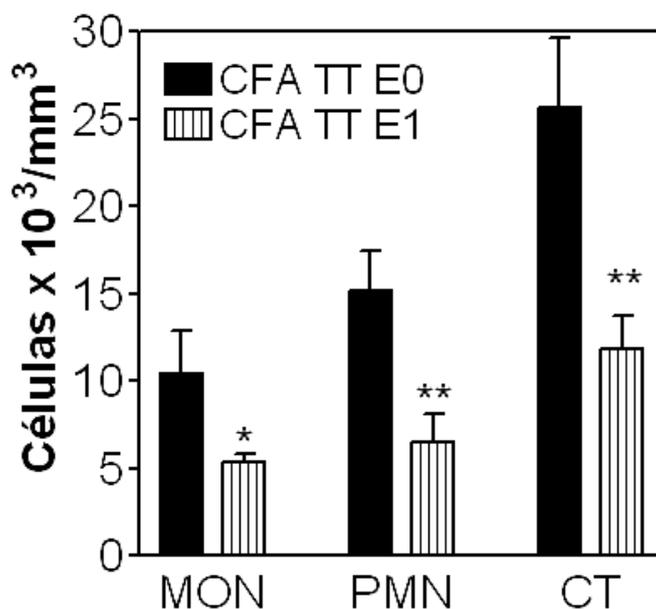


GRÁFICO 16 - Efeito do exercício de 1 minuto diário na migração celular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,01$ (**).

4.3 ETAPA 3: PROTOCOLO DE EXERCÍCIO PROGRESSIVO

Após a finalização da segunda etapa, iniciaram-se os experimentos da terceira etapa que consistiu na realização do exercício progressivo. Os dados foram expressos de forma semelhante aos dados da segunda etapa, com relação a IA, DA, EA e migração de leucócitos.

Os resultados obtidos revelaram que o exercício progressivo promoveu uma redução do TEP, significativa para $p \leq 0,01$, no décimo dia de avaliação para a articulação tíbio-femural (TEP 10^o dia grupo E00: $20,32 \pm 2,16$; TEP 10^o dia grupo EP: $11,91 \pm 1,06$). Na articulação tíbio-társica observou-se diminuição significativa do TEP para $p \leq 0,01$ a partir do quinto dia de avaliação (TEP 5^o dia, grupo E00: $46,00 \pm 3,00$ s; TEP 5^o dia grupo EP: $34,17 \pm 3,67$ s; TEP 10^o dia grupo E00: $31,04 \pm 3,31$ s; TEP 10^o dia grupo EP: $19,00 \pm 3,72$ s) (GRÁFICOS 17 e 18).

De acordo com os resultados, o exercício progressivo também promoveu uma redução significativa do DA na articulação tíbio-femural ($p \leq 0,001$) e do EA na articulação tíbio-társica ($p \leq 0,001$) (GRÁFICOS 19 e 20).

O exercício progressivo reduziu significativamente a migração de leucócitos na articulação TF ($p \leq 0,05$, MON grupo E00: $5990,2 \pm 1539,7$ e MON grupo EP: $2700,0 \pm 249,2$ mononucleares/ mm^3 ; $p \leq 0,01$, PMN grupo E00: $14239,8 \pm 2696,3$ e PMN grupo EP: $6391,6 \pm 553,7$ polimorfonucleares/ mm^3 ; $p \leq 0,01$, CT grupo E00: $20230,0 \pm 3774,4$ e CT grupo EP: $9091,6 \pm 696,3$ leucócitos/ mm^3). Todavia, com relação à articulação TT o exercício progressivo não promoveu redução significativa para a migração de leucócitos, demonstrando apenas uma tendência à redução de células mononucleares (MON grupo E00: $8842,2 \pm 1686,5$ e MON grupo EP: $5956,1 \pm 765,7$ mononucleares/ mm^3 ; PMN grupo E00: $12343,2 \pm 2162,8$ e PMN grupo EP: $12493,2 \pm 2440,1$ polimorfonucleares/ mm^3 ; CT grupo E00: $21185,7 \pm 1712,4$ e CT grupo EP: $18450,0 \pm 2542,4$ leucócitos/ mm^3) (GRÁFICOS 21 e 22).

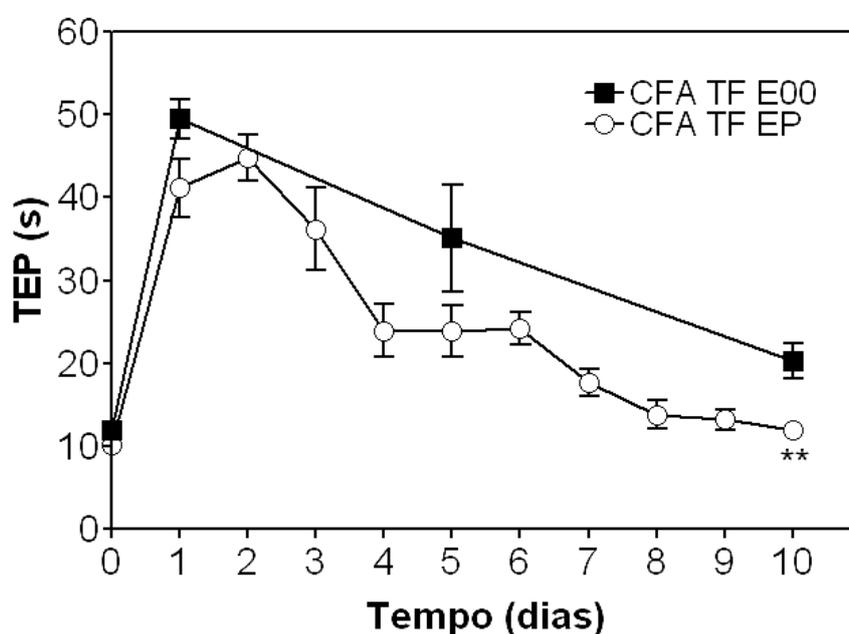


GRÁFICO 17 - Efeito do exercício progressivo na incapacitação articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF EP, $n=6$) com artrite induzida por CFA ($0,5 \text{ mg/mL}$, *Mycobacterium butyricum*, $50 \mu\text{L}$). O grupo controle (CFA TF E00; $n=6$) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA ($n=12$). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,01$ (**).

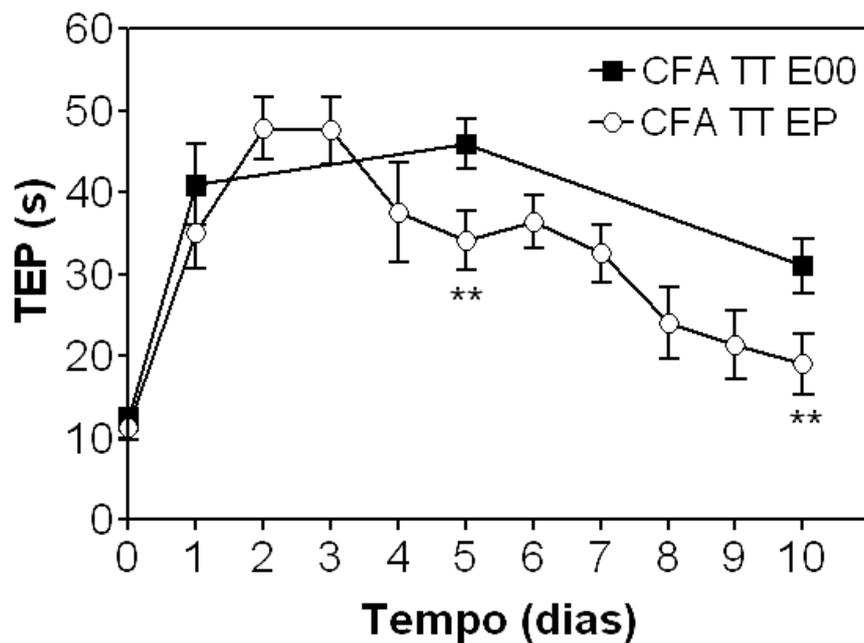


GRÁFICO 18 - Efeito do exercício progressivo na incapacitação articular da articulação tíbio-társica de ratos fêmeas (CFA TT EP, n=7) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E00; n=7) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=14). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,01$ (**).

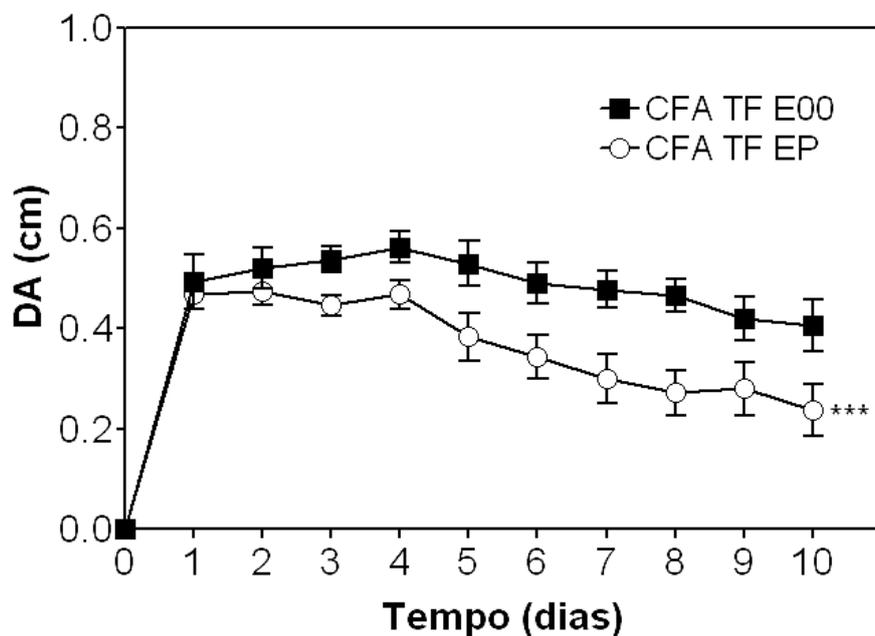


GRÁFICO 19 - Efeito do exercício progressivo no diâmetro articular da articulação tíbio-femural de ratos fêmeas (CFA TF EP, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TF E00; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,001$ (***)

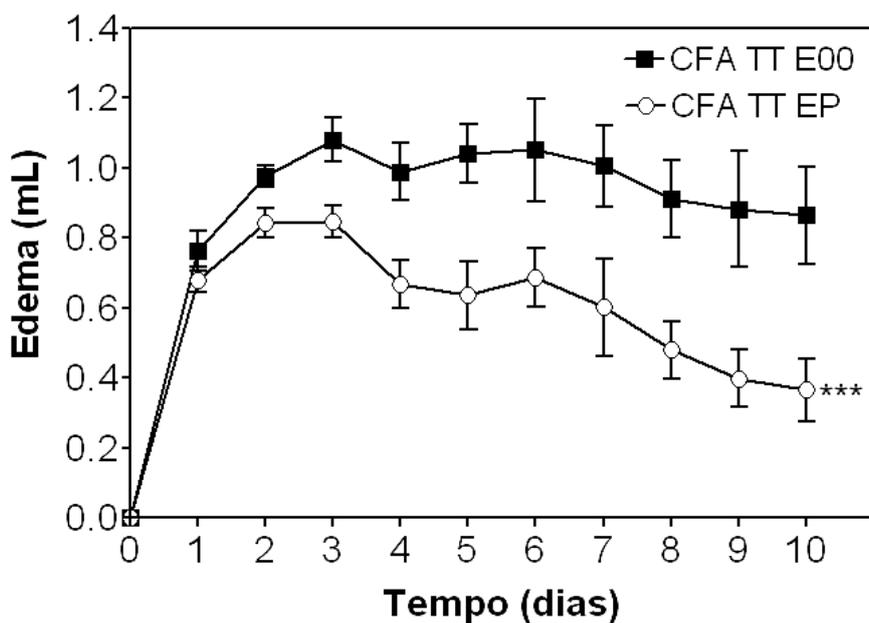


GRÁFICO 20 - Efeito do exercício progressivo no edema de pata da articulação tibio-társica de ratos fêmeas (CFA TT EP, n=7) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E00; n=7) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=14). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,001$ (***)

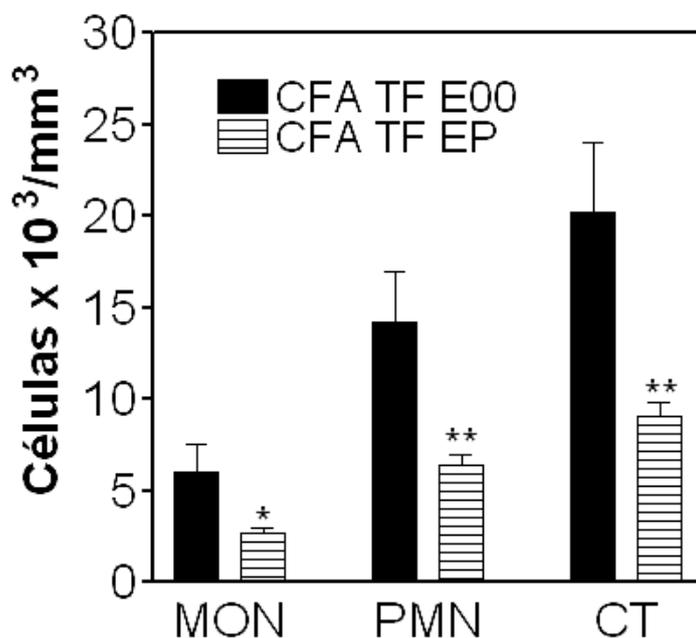


GRÁFICO 21 - Efeito do exercício progressivo na migração celular da articulação tibio-femoral de ratos fêmeas (CFA TF E1, n=6) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TF E0; n=6) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=12). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,05$ (*) e $p \leq 0,01$ (**).

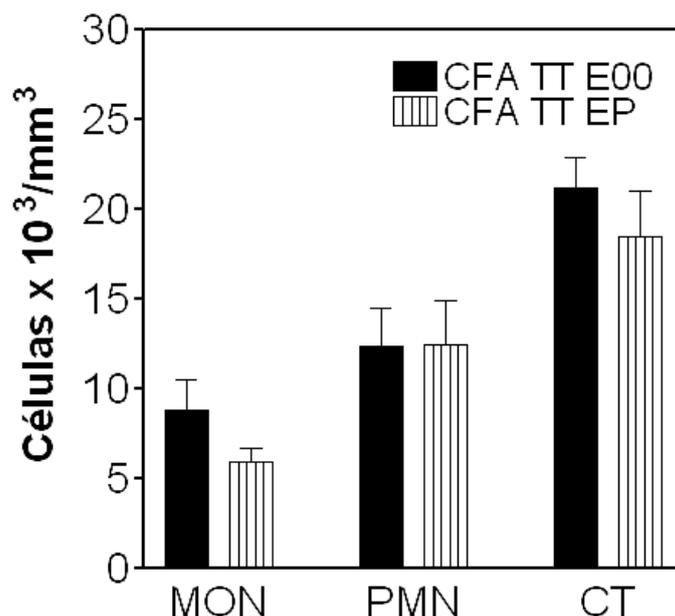


GRÁFICO 22 - Efeito do exercício progressivo na migração celular da articulação tibio-társica de ratos fêmeas (CFA TT E1, n=7) com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL, *Mycobacterium butyricum*, 50 μ L). O grupo controle (CFA TT E0; n=7) não realizou o exercício. Ambos os grupos receberam CFA (n=14). Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,05$.

Realizou-se um experimento complementar, para avaliar a possível influência de corticóides endógenos decorrente de estresse, nos resultados do estudo. Para isso, induziu-se monoartrite na articulação tibio-társica de 12 animais que foram submetidos ao exercício progressivo. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças entre o grupo que recebeu aminoglutetimida (n=06) e o grupo que recebeu água (controle; n=06) em relação ao TEP, edema e migração de leucócitos, para $p \leq 0,05$ (GRÁFICOS 23, 24 e 25). Observou-se através do gráfico 25, onde o grupo controle realiza o exercício progressivo e recebe apenas água, que os resultados de células apresentou quantidades diferentes para o mesmo tamanho da amostra do grupo experimental EP do gráfico 22.

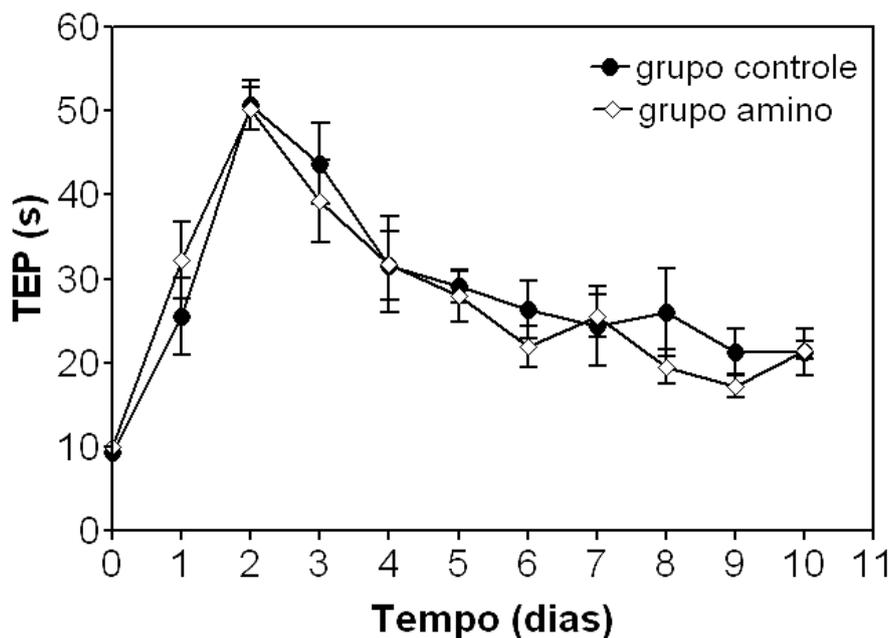


GRÁFICO 23 - Efeito da administração de aminoglutetimida (50mg/kg; grupo amino, n=6) na incapacitação articular durante o exercício progressivo realizado em ratos fêmeas com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL) na articulação tíbio-társica. O grupo controle (grupo água; n=6) recebeu água. Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,05$.

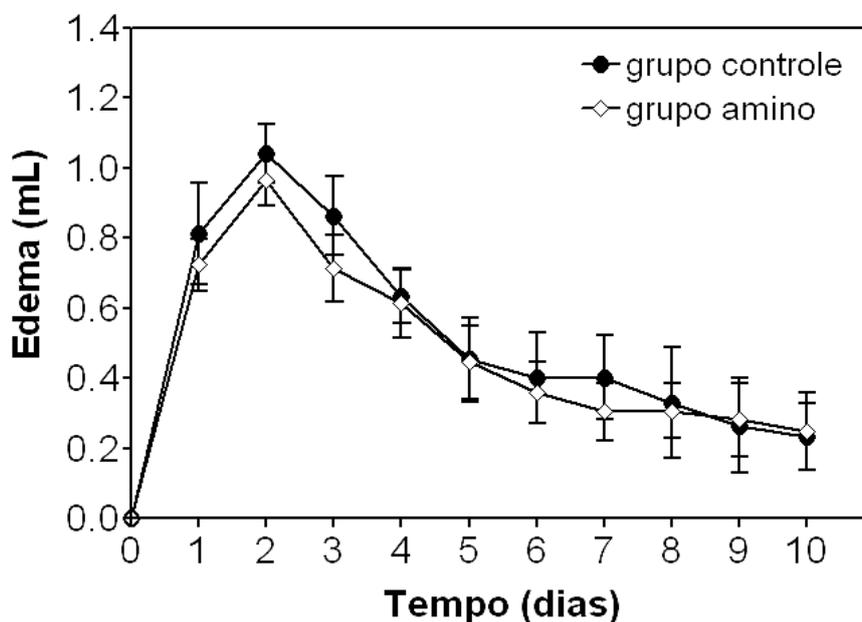


GRÁFICO 24 - Efeito da administração de aminoglutetimida (50mg/kg; grupo amino, n=6) no edema articular, durante o exercício progressivo realizado em ratos fêmeas com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL) na articulação tíbio-társica. O grupo controle (grupo água; n=6) recebeu água. Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,05$.

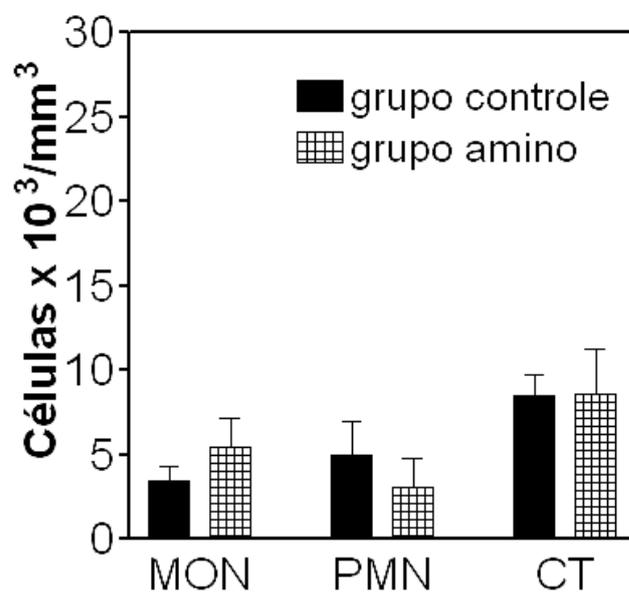


GRÁFICO 25 - Efeito da administração de aminoglutetimida (50mg/kg; grupo amino, n=6) na migração de leucócitos durante o exercício progressivo realizado em ratos fêmeas com artrite induzida por CFA (0,5 mg/mL) na articulação tíbio-társica. O grupo controle (grupo água; n=6) recebeu água. Utilizou-se teste t de Student, $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os cinco experimentos realizados permitiram estabelecer a padronização do modelo de indução de artrite por CFA, que forneceram informações indispensáveis para o conhecimento das curvas de incapacitação e edema necessárias para a continuação do estudo. A escolha do tipo de CFA contendo a *Mycobacterium butyricum* foi realizada após a constatação da severidade e perda de ratos por aspecto necrótico da pata, relatados no terceiro experimento, no qual se utilizou CFA com a *Mycobacterium tuberculosis*. Desse modo, optou-se por utilizar a *Mycobacterium butyricum*, pelo fato desta espécie induzir uma artrite menos severa. Como este estudo teve como objetivo a indução de artrite duradoura, optou-se por fazer a inoculação do CFA primeiramente por via sistêmica (injeção intradérmica na base da cauda) e, posteriormente uma reinjeção local (intra-articular, TT ou TF) com intervalo de 21 dias entre as duas injeções de CFA. Observou-se o desenvolvimento de artrite severa e prolongada em ambas as articulações, TT e TF. Sendo assim, resolveu-se utilizar dois modelos experimentais. Observou-se também que não houve diferenças significativas nas respostas à indução da artrite relacionadas ao sexo dos animais. Deste modo, optou-se por fêmeas devido à maior disponibilidade destas no Biotério Central da UFSC.

O modelo de artrite induzida por CFA em fêmeas desenvolvido neste estudo resultou em desenvolvimento de monoartrite restrita à articulação de inoculação e caracterizada por inflamação, presença de edema articular e intensa migração celular para a cavidade articular. Este modelo desenvolvido para este estudo, servirá para outras pesquisas que estão sendo realizadas no LANEN- UFSC.

Observou-se de acordo com os resultados apresentados que o exercício de 1 minuto e progressivo, durante 10 dias tiveram efeito nas variáveis do estudo. Os resultados apresentados com relação à incapacitação articular demonstram que o exercício progressivo diminuiu a nocicepção dos animais, tanto para a articulação tíbio-társica quanto tíbio-femural. O exercício diário de 1 minuto demonstrou uma tendência em diminuir a incapacitação articular, para a articulação tíbio-társica, porém não foi significativa.

Estes resultados concordam com pesquisas desenvolvidas por Abell *et.al.*, (2006); Benhamou, (2007), Carvalho *et.al.*, (2000); Fransen (2004); Rall e Roubenoff (2000); Shih

et.al., (2006); Van den Ende *et.al.*(1998) e com o OTTAWA PANEL (2004) que demonstraram que a atividade física diminui a dor em pacientes com artrite reumatóide. Pesquisas como a de Astrand (1987) têm sugerido que a atividade física é uma modalidade de tratamento para o alívio da dor em pacientes com artrite reumatóide, trazendo benefícios na mobilidade de estruturas periarticulares, incluindo cápsula articular, tendões e músculos.

Ekdhal *et.al.* (1990) sugeriram que este efeito hipalgésico é decorrente da liberação de β -endorfinas promovida pelo exercício. Porém, em nosso experimento não verificamos esta possibilidade de liberação de endorfinas. Constatamos, todavia, que não houve influência do corticóide endógeno, proveniente de stress, na diminuição do TEP durante a realização do exercício. A administração de aminoglutetimida, agente inibidor da síntese do cortisol (ALHEIRA; BRASIL, 2005), suprime a produção de corticóide endógeno. O nosso estudo demonstrou que não houve diferenças na incapacitação articular entre o grupo que recebeu aminoglutetimida e o grupo que recebeu água.

Pesquisas de Raja *et.al.* (1999) afirmam que a mobilização dentro do limite de amplitude de movimento numa articulação inflamada pode gerar sensibilização de nociceptores aferentes primários, e apenas um movimento leve da articulação pode gerar dor. Schaible e Grubb (1993) concordam com este achado experimental admitindo que na doença associada à dor articular, esta sensação é induzida ou agravada durante o movimento. Considerando que o teste de incapacitação articular é um teste que avalia dor espontânea à mobilização, os resultados obtidos neste estudo contrariam estas pesquisas, demonstrando que a nocicepção é reduzida em animais que realizam o movimento em relação ao controle. Nos dois protocolos de exercício, não houve aumento de dor decorrente da movimentação. Este achado é importante, visto que muitos pacientes se afastam da atividade física pelo medo da sensação de dor (SHIH *et.al.*, 2006).

É interessante considerar que os animais utilizados neste experimento possuem uma postura quadrúpede e não uma postura bípede, como a humana. O animal quadrúpede tem boa estabilidade, pois ao caminhar, desloca a projeção do seu centro de gravidade em uma base retangular, formada pelos quatro membros. Já o centro de gravidade do ser humano quando caminha, se desloca apenas poucos centímetros, pois os pés se localizam próximos a linha média do corpo, possuindo menos estabilidade na marcha, e assim, exigindo mais

dos músculos e das articulações dos membros inferiores (BORGES FILHO; ALMEIDA, 2004).

Considerando também que, neste estudo, foi realizada uma monoartrite, ou seja, a indução de artrite apenas em uma pata, durante a deambulação os animais permaneceram com três patas “livres de dor” para o apoio (não é possível afirmar que estes animais não sentiram dor nas outras patas). Em humanos, isto não seria possível, pelo apoio bipodal e pela característica simétrica da artrite reumatóide. Estas considerações dificultam a inferência destes resultados para humanos, porém, acredita-se que mesmo com estas diferenças a realização de atividade física contribui efetivamente para uma melhoria clínica da artrite reumatóide, visto o grande número de publicações, com trabalhos em humanos, que defendem esta prática.

O exercício atua em pacientes com artrite diminuindo a dor, regulando a pressão sanguínea, aumentando a força muscular e óssea, aumentando a massa magra e diminuindo a massa gorda, melhorando o bem-estar psicológico, reduzindo o risco de depressão e melhorando o humor (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002). Em mulheres com artrite a incidência de depressão e ansiedade é aumentada (DICKENS *et.al.*, 2002). Lin *et.al.* (2003) em suas pesquisas constataram que cuidados com a depressão em indivíduos com artrite têm melhorado a dor também. É interessante ressaltar, que a prática de atividade física melhora a dor e a depressão de indivíduos com artrite, e assim, promove melhoria na qualidade de vida destes pacientes (ABELL *et. al.*, 2005). O exercício também produz um estresse ósseo que estimula a absorção de cálcio, contrapondo-se aos efeitos danosos decorrentes da imobilização e de medicamentos como os corticosteróides (CARVALHO *et.al.*, 2000). Outra preocupação é a fraqueza muscular decorrente da perda de massa muscular conhecida como caquexia reumatóide em que a mais efetiva intervenção terapêutica conhecida até agora é o exercício físico, por normalizar o metabolismo protéico (WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Esses benefícios ocorrem sem efeitos adversos na função imune ou no estado da doença (RALL *et. al.*, 1996).

O exercício de 1 minuto e o exercício progressivo demonstraram efeito na redução do edema para as duas articulações. Isto demonstra que o exercício possui efeito na redução do exudato inflamatório. O exercício de 1 minuto diário por até 10 dias consecutivos

diminuiu a quantidade de leucócitos apenas na articulação TT. O exercício progressivo reduziu a quantidade de leucócitos na articulação TF, demonstrando apenas tendência estatística para a articulação TT com relação à diminuição de células mononucleares. A comparação dos gráficos 22 e 25, grupo experimental (gráfico 22) e o grupo controle (gráfico 25), demonstram que os resultados de células apresentaram quantidades diferentes para o mesmo tamanho da amostra, justificando uma grande variabilidade para a migração celular. Acredita-se que o efeito do exercício progressivo na migração celular da articulação tíbio-társica tenha sido prejudicado pelo tamanho pequeno da amostra e pelo fato de que, durante o experimento, ocorreu um edema mais severo e por isso houve exclusão de animais.

Apesar do programa de reabilitação conter exercícios terapêuticos no tratamento dos sintomas da artrite reumatóide (KAVUNCU; EVCIK, 2004), até onde se sabe, não existem pesquisas sobre a diminuição do edema e da migração de leucócitos pelo exercício físico. Alguns autores como Marques e Kondor (1998) afirmam que o aumento do edema em pacientes com osteoartrite é indicativo de excesso de exercício. Segundo Kavuncu e Evcik (2004) a atividade de caminhada pode aumentar a pressão intra-articular em pacientes com inflamação e edema do joelho e, que esta atividade deve ser realizada apenas na fase de remissão da doença. Buttler *et.al.* (1991) administraram seis injeções de 0,05 mL de CFA contendo 300 mg de *Micobacterium butyricum* na articulação tíbio-társica e submeteram os animais ao nado com frequência de três vezes por semana, aumentados de 5 a 15 minutos, durante 4 semanas. Estes autores relataram que com relação ao edema e mobilidade não houve alterações, porém em relação ao limiar de dor em resposta ao teste de pressão da pata houve diminuição quando comparado ao grupo controle. Estas pesquisas contradizem o constatado nos resultados apresentados neste trabalho. Entretanto, o tipo de atividade física, a intensidade do exercício realizado ou até mesmo a forma de avaliação escolhida podem ter contribuído para tais diferenças. A avaliação do limiar de dor utilizado por Buttler e colaboradores (1991) não é um modelo que avalia dor espontânea ao movimento.

O protocolo de atividade física utilizado no presente estudo mostrou uma redução não apenas na dor, mas também no edema e na migração celular, demonstrando que a atividade física traz melhorias na evolução do quadro da doença. Esta redução do edema decorrente do exercício é uma inovação para o tratamento de artrite reumatóide, pois não

foram encontradas pesquisas em literatura que relatassem este efeito. Porém, neste estudo, não foi verificado o mecanismo pelo qual o exercício diminui o edema.

O tipo de atividade física e a intensidade do exercício podem interferir nos resultados obtidos em pacientes com artrite reumatóide. De fato, exercícios físicos muito vigorosos não são recomendados para pacientes com a atividade da doença ativa (OTTAWA PANEL, 2004). Rall e Roubenoff (2000) sugerem que durante a fase ativa da doença, exercícios sem carregamento de pesos são adequados e que quando houver controle da doença, atividades com carga podem ser prescritas. O Painel Especialista em Artrite e Atividade física, desenvolvido em 2003 por especialistas, recomenda que indivíduos com artrite devem realizar, com segurança, 30 minutos de atividade física com intensidade moderada de no mínimo três vezes na semana (SHIH *et.al.*, 2006; WORK GROUP RECOMMENDATIONS, 2003).

A deambulação, utilizada neste estudo, é classificada como atividade de baixo impacto e, por isso, deve representar riscos reduzidos ao sistema cardio-circulatório (LIMA, 1998). A inclusão destes pacientes nesta prática é importante, visto os benefícios trazidos pelo exercício. Para esta inclusão, avaliações periódicas de uma equipe multidisciplinar e o acompanhamento destes pacientes por fisioterapeuta e educadores físicos num programa individualizado de exercícios, traria segurança a estes indivíduos (WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Os pacientes devem ser orientados quanto à forma correta de realizar suas atividades com segurança (RALL; ROUBENOFF, 2000). De acordo com nossos resultados, esta atividade pode ser prescrita desde o início do tratamento, começando com um tempo de atividade curto, aumentando progressivamente.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o modelo de indução de artrite padronizado obteve os propósitos do estudo de induzir uma artrite crônica e duradoura, que permitiu o conhecimento das curvas de incapacitação e edema articulares para que fosse possível a realização desta pesquisa, considerando que foram realizados poucos trabalhos sobre atividade física em artrite induzida por CFA. A atividade física, principalmente o exercício progressivo, tem efeito na nocicepção, no edema e na migração de leucócitos em animais com artrite induzida por CFA. O exercício progressivo reduziu a nocicepção dos animais com artrite nas duas articulações avaliadas. O edema foi reduzido nos dois protocolos de exercícios e nas duas articulações, TF e TT. Este achado pode contribuir significativamente para estudos posteriores, visto que até onde sabemos, não há pesquisas que revelem a diminuição do edema decorrente do exercício em pacientes artríticos. A migração celular apresentou efeito antiinflamatório para alguns grupos (grupo TT para o exercício de 1 minuto e grupo TF para o exercício progressivo), demonstrando que o exercício mostrou uma tendência em diminuir a quantidade de leucócitos presentes na articulação. A diferença no número de células entre grupos diferentes mostra uma variabilidade neste parâmetro, justificando, desse modo, um aumento do tamanho da amostra em futuros estudos.

A preocupação sobre a mobilização melhorar a funcionalidade da articulação surgiu com pesquisas realizadas com animais no Laboratório de Instrumentação (LABIN – UDESC) onde demonstrou-se que a imobilização (ausência de movimento) por si só prejudica a função articular normal (INDALÊNCIO, 2007). A experiência com animais favoreceu neste estudo, considerando a dificuldade de realizar os experimentos em humanos, devido a concepções de que o movimento agrava a dor. Sendo assim, o presente estudo demonstrou que a realização da deambulação desde o início da atividade da doença pode contribuir consistentemente para melhorar a dor, o edema e também apresentar um efeito antiinflamatório. Estes achados podem chamar a atenção de profissionais da saúde quanto à necessidade de pesquisas em humanos com artrite reumatóide, pois se constatados os resultados apresentados, novos métodos de tratamento serão alcançados e conseqüentemente uma maior adesão em programas de atividade física e, com isso, uma

melhoria na qualidade de vida destes pacientes. A esperança de que estes resultados seriam produzidos em humanos aumentam a segurança do clínico para prescrever os exercícios para os seus pacientes.

Há muito trabalho a ser feito, desta forma, sugerem-se estudos em indivíduos com artrite reumatóide com diferentes tipos de atividade física ou mesmo diferentes tempos de caminhada ou diferentes intensidades, com avaliações constantes de dor e edema, realizados desde a constatação do diagnóstico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELL, J. I.; HOOTMANN, J. M.; ZACK, M. M.; MORIARTY, D.; HELMICK, C. G. Physical activity and health related quality of life among people with arthritis. **Journal of Epidemiology and Community Health**. v. 59. p. 380-385. 2005.
- ADAMS, J. C.; HAMBLEN, D. L. **Manual de Ortopedia**. 11^aed. São Paulo: Artes Médicas, 1994.
- ALHEIRA, F. V.; BRASIL, M. A. A. O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor – uma revisão. **Revista Psiquiatria do Rio Grande do Sul**. v. 27. n. 2. p. 177-186. 2005.
- ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL PARA O ESTUDO DA DOR – IASP. 1983.
- ASTRAND, P. Exercise Physiology and its role in disease prevention and rehabilitation. **Archives of Physical Medicine Rehabilitation**. v. 68. p. 305-309. 1987.
- BANIK, R. K.; KASAI, M.; MIZUMURA, K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. **Experimental Animals**. v. 51. p. 197-201. 2002.
- BARS, D. L.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53. p. 597-652, 2001.
- BARTON, N. J.; STEVENS, D. A.; HUGHES, J. P.; ROSSI, A. G.; CHESSELL, I. P.; REEVE, A. J.; McQUEEN, D. S. Demonstration of a novel technique to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. **Journal of Inflammation**. v. 4. n. 13. 2007.
- BENHAMOU, M-A. M. Reconditioning in patients with rheumatoid arthritis. **Annales de réadaptation et de Médecine physique**. v. 50. p. 382-385. 2007.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's Adjuvant in experimental models of autoimmune disease. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 70. p. 846-860. 2001.

- BORGES FILHO, R.; ALMEIDA, S. J. A. Locomoção humana: diretrizes terapêuticas com base nos conhecimentos evolutivos. **Arquivos de Ciências da Saúde**. v. 11. n. 2. 2004.
- BRESSAN, E. **Envolvimento de citocinas pró e antiinflamatórias na incapacitação e edema articular e na migração celular no modelo de artrite induzida por LPS em ratos**. Dissertação. Mestrado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2005.
- BRESSAN, E; CUNHA, F. Q.; TONUSSI, C. R. Contribution of TNF α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**. v. 36. p. 83–89. 2006.
- BRANDÃO, L.; FERRAZ, M. B.; ZERBINI, C. A. F. Avaliação da qualidade de vida na artrite reumatóide: revisão atualizada. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.37. n.5. 1997.
- BUCKLEY, C. D. Why do leucocytes accumulate within chronically inflamed joints? **Rheumatology**. v. 42. p. 1433-1444. 2003.
- BUTLER, S. H.; GODEFROY, F.; BESSON, J. M.; WEIL-FUGAZZA, J. Increase in "pain sensitivity" induced by exercise applied during the onset of arthritis in a model of monoarthritis in the rat. **International Journal of Tissue Reactions**. 13. n.6. p.299-303. 1991.
- CAI, X.; WONG, Y. F. ZHOU, H.; LIU, Z. Q.; XIE, Y.; JIANG, Z. H.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. **Inflammation Research**. v. 55. p. 368- 377. 2006.
- CAILLIET, Rene. **Dor no joelho**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2001. 259p.
- CANNON, G. W.; WOODS, M. L.; CLAYTON, F.; GRIFFITHS, M. M. Induction of arthritis in DA rats by Incomplete Freund's Adjuvant. **The Journal of Rheumatology**. v. 20. n. 7. 1993.
- CARVALHO, E. S.; FERRAZ, M. B; CICCONELI, R. M. Mycobacterium Tuberculosis versus artrite reumatóide: associação ou relação causal? Um século de história. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.42. n.2. 2002.

CARVALHO, M. R. P.; SALLES, C. A. F.; TEBEXRENI, A. S.; BARROS NETO, T. L.; CONFESSOR, Y. Q.; NATOUR, J. Artrite Reumatóide: treinamento cardiovascular. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 40. n. 2. 2000.

COOK, C.D.; MOORE, K.I. Effects of sex, hindpaw injection site and stimulus modality on nociceptive sensitivity in arthritic rats. **Physiology & Behavior**. v. 87. p. 552-562. 2006.

COSTA, M.C.; SUTTER, P.; GYBELS, J.; VAN HEES, J. Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible model of chronic pain. **Pain**. v.10. p. 173-185. 1981.

CRUZ, M.; BRANCO, J. C. Artrite Reumatóide: Fatores de Prognóstico e Seguimento. **Acta Reumática Portuguesa**. v. 27. p. 183-190. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Public Health and Aging**: Projected Prevalence of Self-Reported Arthritis or Chronic Joint Symptoms Among Persons Aged ³ 65 years- United /states, 2005-2030. **MMWR**. v. 52. n. 21. p. 489-491. 2003.

DAHER, J. B.; MELO, M. D.; TONUSSI, C. R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**. v. 76. p. 2349-2359. 2005.

DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; McQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 49. p. 5-10. 1993.

DICKENS, C.; MCGOWAN, L.; CLARCK-CARTER, D.; CREED, F. Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**. v. 64. p. 52-60. 2002.

EKDHAL, C.; ELKMANN, R. ANDERSON, S. L.; MELANDER, A.; SVENSSON, B. Dynamic training and circulating levels of corticotropin-releasing factor, beta-lipotropin and beta-endorphin in rheumatoid arthritis. **Pain**. v.40. p. 35-42. 1990.

EKDHAL, C.; ANDERSON, S.L.; SVENSSON, B. Muscle function of the lower extremities in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a descriptive study of patients in a primary health care district. **Journal Clinical of Epidemiology**. v.42. p. 947-954. 1989.

ENOKA, R. **Bases Neuromecânicas da Cinesiologia**. 1 ed. São Paulo: Ed. Manole, 2000.

- FERREIRA, M. A. F.; YOSHINARI, N. H.; LAURINDO, I. M. M. Análise quantitativa radiográfica de mãos de pacientes com artrite reumatóide: progressão das alterações radiográficas comparando diferentes métodos de avaliação. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 40. n.2. mar/abr, 2000.
- FIEDMANN, S.V. Exercise for the person with rheumatoid arthritis. In: CHANG. Rehabilitation of persons with rheumatoid arthritis. Rehabilitation Institute of Chicago. **Aspen Publication**. p. 91-102. 1996.
- FIRESTEIN, G.S. Evolving Concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**. v. 423. 2003.
- FRANSEN, M. When is physiotherapy appropriate? **Best Practice & Research**. v. 18. n. 4. p. 477-489. 2004.
- GABRIEL, M. R. S.; PETIT, J. D.; CARRIL, M. L. S. **Fisioterapia em traumatologia, ortopedia e reumatologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- GASTON, J. S.; LIFE, P. F.; JENNER, P. J.; COLSTON, M. J.; BACON, P. A. In vitro responses to a 65-kilodalton mycobacterial protein by synovial T cells from inflammatory arthritis patients. **The Journal of Immunology**. v. 143. p. 2494. 1989.
- GASTON, J. S.; LIFE, P. F.; BAILEY, L. C.; BACON, P. A. Recognition of a micobacteria-specific epitope in the 65-kD heat-shock protein by synovial fluid-derived Tcell clones. **The Journal of Experimental Medicine**.v.171. p. 831-41. 1990.
- GLENN, E. M.; GRAY, J. Adjuvant-induced polyarthritis in rats: biologic and histologic background. **American Journal of Veterinary Research**. v. 26. n.114. p. 1180-94. 1965.
- GOLGING, D. N. **Reumatologia em medicina e reabilitação**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.
- GUERREIRO, A. T. G.; VERRY JR, W.A.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; ROCHA, F. A. C.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joints flexion in mice: A novel experimental arthritis model for

pharmacological screening. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 84. p. 244-251. 2006.

HAMIL, J.; KNUTZEN, K. M. **Bases Biomecânicas do Movimento Humano**. São Paulo: Manole, 1999.

HOLOSHITZ, J.; KLAJMAN, A.; DRUCKER, I.; LAPIDOT, Z.; YARETZKY, A. ; FRENKEL, A.; VAN EDEN, W.; COHEN, I. R. COHEN. T lymphocytes of rheumatoid arthritis patients show augmented reactivity to a fraction of mycobacteria cross-reactive with cartilage. **The Lancet**. v. 2. p. 305. 1986.

HOLOSHITZ, J., MATITIAU, A.; COHEN, I. R. Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes responsive to mycobacteria but not to collagen type II. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 73. p. 211. 1984.

HIGO, Y.; TAKAHASHI, T.; TAMATANI, T.; MIYASAKA, M.; HIGASHIDA, T.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; TSUKADO, W. ICAM-1-dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats. **The Journal of Immunology**. v. 15. n. 147. p. 4167-4171. 1991.

INDALÊNCIO, N. R. **Análise da resistência do Tecido Periarticular de Joelhos de ratos ao movimento de flexão Fisiológico após Diferentes Tempos de Imobilização**. Dissertação. Mestrado em Ciências do Movimento Humano. Centro de Ciências da Saúde e do Esporte. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Florianópolis, 2007.

INSTITUCIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE - IACUC. **Guidelines for the use of Complete Freund's Adjuvant**. Case Western Reserve University. Dec, 2001. Disponível em: < <http://iacuc.cwru.edu/policy/freunds.html> > Acesso em: 15 jan. 2006.

JAYSON, M. I. V. Rheumatoid Arthritis. In: WALL P. D. ; MELLZACK, R.. **Textbook of Pain**. 4 ed. Churchill Livingstone: London. p. 11-57, 1999.

KANNAN, K. W.; ORTMANN, R. A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**. v. 12. p. 167-181. 2005.

KAPANDJI, I. A. **Fisiologia articular: esquemas comentados de mecânica humana** . 4. ed. v.3. São Paulo: Manole, 1980.

KAVUNCU, V; EVCIK, D. Physiotherapy in Rheumatoid Arthritis. **Medscape General Medicine**. v. 6. n. 3. 2004.

KETUNEN, J. A.; KUJALA, U. M. Exercise therapy for people with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. v.14. p. 138-142. 2004.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**. v. 12. p. 153-165. 2005.

KRAAN, M. The development of clinical signs of rheumatoid sinovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). **Arthritis Research**: v. 3, n. 1. 2000.

LAURINDO, I. M. M.; PINHEIRO, G. R. C.; XIMENES, A. C.; BERTOLO, M. B.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; CICONELLI, R. M.; RADOMINSKI, S. C.; LIMA, F. A. C.; BATISTELA, L. M.; ALENCAR, P. Consenso Brasileiro para o Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 42. n. 6. p.355-361. 2002.

LAURINDO, I. M. M.; XIMENES, A. C.; LIMA, F. A. C.; PINHEIRO, G. R. C.; BATISTELLA, L. R.; ALENCAR, P. XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; CICONELLI, R. M.; RADOMINSKI, S. C. **Artrite Reumatóide: Diagnóstico e Tratamento**. SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. v. 1. 2002.

LEFEBVRE, J. C. The relationship of arthritis self-efficacy to daily pain, daily mood, and daily pain coping in rheumatoid arthritis patients. **Pain**. v. 80. p. 425-435. 1999.

LEVINE, J.; REICHLING, D. B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: **Textbook of Pain**. P.D. Wall & R. Mellzack. 4 ed. Churchill Livingstone: London. p. 59-84, 1999.

LIBERMAN, B. **Papel da terapia medicamentosa na síndrome de Cushing**. Arquivo Brasileiro Endocrinologia. Metabolismo. v. 47. n. 4. p.381-387. 2003.

- LIMA, D. F. **Caminhadas: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Sprint, 1998. 105p.
- LIN, E. H.; KATON, W.; VON KORFF, M.; Effect of improving depression care on pain and functional outcomes among older adults with arthritis: a randomized controlled trial. **JAMA: The Journal of American Medical Association**. v. 209. p. 2428-2429. 2003.
- LOPES, A. **Dicionário de Fisioterapia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005.
- MACGREGOR, A. J. Classification criteria for rheumatoid arthritis. **Baillière's Clinical Rheumatology**. v. 9. n. 2. 1995.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 75. n. 4. p.469-486. 2003.
- MARQUES, A. P.; KONDO, A. A fisioterapia na osteoartrose: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 38. n. 2. 1998.
- MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurones in pain. **Pain**. v. 43. p. 269-272. 1990.
- MENSE, S. Slowly conducting afferent fibres from deep tissues: neurobiological properties and central nervous actions. **Progress in Sensory Physiology**. v.6. p. 139-219, 1986.
- MESKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic Pain**. 2 ed. IASP Task Force on Taxonomy. IASP Press. p. 209-214. 1994.
- MINISTÉRIO DA SAUDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. Artrite Reumatóide. Portaria SAS/MS. n. 865. 2002.
- MOREIRA, C; CARVALHO, M. A. P. **Noções Práticas de Reumatologia**. 2 ed. v.2. Belo Horizonte: Livraria e Editora Health, 1996. 484p.
- MOSS, P.; SLUKA, K.; WRIGHT, A. The initial effects of knee joint mobilization on osteoarthritic hyperalgesia. **Manual Therapy**. 2006.

- MOUDGIL, K. D.; CHANG, T. T.; ERADAT, H.; CHEN, A. M.; GUPTA, R. S.; BRAHN, E.; SERCARZ, E. Diversification of T cell responses to carboxy-terminal determinants within the 65-kD heat-shock protein is involved in regulation of autoimmune arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 185. p. 1307. 1997.
- MULLER-LADNER, U.; PAP, T.; GAY, R. E.; NEIDHART, M.; GAY, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nature**. v. 1. n. 2. 2005.
- NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. Allodynia and Hyperalgesia in Adjuvant-Induced Arthritic rats: Time course of progression and efficacy of analgesics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 12. p. 167-181. 2003.
- NAIEINI, R. S.; CAHILL, C. M.; RIBEIRO-DA SILVA, A.; MENARD, H. A.; HENRI, J. L. Remodelling of spinal nociceptive mechanisms in an animal model of monoarthritis. **European Journal of Neuroscience**. v. 22. p. 2005-2015. 2005.
- NIEMAN, David C. **Exercício e saúde**. São Paulo: Manole, 1999.
- NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.
- OTTAWA PANEL: Evidence-Based Clinical Practice Guidelines for Therapeutic Exercises in the Management of Rheumatoid Arthritis in Adults. **Physical Therapy**. v. 84. n. 10. p. 934-972. 2004.
- PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 91. n. 1. p. 95-101. 1956.
- PERRY, J. **Análise da marcha**. v. 2: Marcha patológica. Barueri, São Paulo: Manole, 2005.
- QUAYLE, A. J.; WILSON, K. B.; LI, S. G.; KJELDSEN-KRAGH, J.; OFTUNG, F.; SHINNICK, T.; SIOUD, M.; FORRE, O.; CAPRA, J. D.; NATVIG, J. B. Peptide recognition, T cell receptor usage and HLA restriction elements of human heat-shock

- protein (hsp) 60 and mycobacterial 65-kDa hsp-reactive T cell clones from rheumatoid synovial fluid. **European Journal of Immunology**. v. 22. p. 1315. 1992.
- RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. Peripheral Neural Mechanisms of nociception. In: **Textbook of Pain**. P.D. Wall & R. Mellzack. 4 ed. Churchill Livingstone: London. p. 11-57, 1999.
- RALL, L. C.; ROUBENOFF, R. Benefits of exercise for patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition in Clinical Care**. v. 3. p. 209–15. 2000.
- RALL, L. C.; ROSEN, C. J.; DOLNIKOWSKI, G.; HARTMAN, W. J.; LUNDGREN, N.; ABAD, L. W.; DINARELLO, C. A.; ROUBENOFF, R. Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor- α . **Arthritis & Rheumatism**. v. 39. n. 7. p.1115-24. 1996.
- RES, P. C.; BREEDVELT, F. C.; VAN- EMBDEN, J. D. A.; SCHAAR, C. G.; VAN- EDEN, W. V.; COHEN, I. R.; DE VRIES, R. R. P. Synovial fluid T cell reactivity against 65kDa Heat- Shock Protein of Micobacteria in early chronic arthritis. **The lancet**. v. 22. p. 478-480. 1988.
- RESNICK, B. Managing arthritis with exercise. **Geriatric Nursing**. v.22. n.3. 2001.
- RODDY, E.; ZHANG, W.; DOHERTY, M. Aerobic walking or strengthening exercise for osteoarthritis of the knee? A sistematic rewiew. **Annals of Rheumatic Diseases**. v. 64. p. 544-548. 2005.
- SALTER, R.B. **Distúrbios e Lesões do Sistema Músculo-Esquelético**. 2ºed. Rio de Janeiro: MEDSI- Editora Médica e Científica LTDA. 1985. p.555.
- SCHAIBLE, H-G.; GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**. v. 55. p. 5-54. 1993.
- SCHAIBLE, H.; SCHIMIDT, R. F. Mechanosensitivity of joint receptors with fine afferent fibre. **Experimental Brain Research**. v. 9. p. 284-297. 1984.

- SHIH, M.; HOOTMAN, J. M.; KRUGER, J.; HELMICK, C. G. Physical Activity in Men and Woman with Arthritis. National Health Interview Survey, 2002. **American Journal of Preventive Medicine**. v. 30. n. 5. p. 385-393. 2006.
- SILMAN, A. J. **Epidemiology of the Rheumatic Deseases**. 2.ed. Oxford University Press. Oxford, 2001.
- SKARE, T. L. **Reumatologia: Princípios e Prática**. 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- SKYBA, D. A.; RADHAKRISHNAN, R; WRIGHT, A; SLUKA, K. A. Joint mobilization reduces hyperalgesia by activation of monoamine receptors but not opioid or GABA receptors in the spinal cord. **Pain**. v. 106. p. 159-168. 2003.
- SLUKA, K. A; SKYBA, D. A.; RADHAKRISHNAN, R.; LEEPER, B. J.; WRIGHT, A. Joint mobilization reduces hyperalgesia associated with chronic muscle and joint inflammation in rats. **The Journal of Pain**. v.7. n.8. p. 202-607. 2006.
- SLUKA, K. A.; WRIGHT, A. Knee Joint mobilization reduces secondary mechanical hyperalgesia inducedby capsaicin into the ankle joint. **European Journal of Pain**. v.5. p. 81-87. 2001.
- STILLS, J. R., BAILEY, M. Q. The use of Complete Freund's Adjuvant. **Laboratory Animals**. v. 20. n. 4. 1991.
- SWINGLE, K. F.; JAQUES, L. W.; KVAN, D. C. Differences in the severity of adjuvant arthritis in four strains of rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 132. p. 608-612. 1969.
- TAUROG, J. D., ARGENTIERI, D. C.; MCREYNOLDS, R. A.. Adjuvant arthritis. **Methods in Enzymology**. v. 162. p. 339. 1988.
- TERRIER, F.; HRICAK, H. L.; REVEL, D; ALPERS, C. E.; REINOLD, C. E.; LEVINE, J.; GENANT, H. K. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of the periarticular inflammatory soft-tissue changes in experimental arthritis of the rat. **Investigative Radiology**. v. 20. p. 813-823. 1985.

- TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**.v. 48. n. 3. p. 421-427. 1992.
- TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Tumor necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**. v. 82. p. 81-87. 1999.
- TOREBJORK, E. Nociceptor activation and pain. Philosophical transactions Royal Society of London series B. **Biological Sciences**. v. 308. p. 227-234. 1985.
- TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **Journal of Experimental Medicine**. v. 146. p. 857-868. 1977.
- TSOULFA, G.; ROOK, G. A. W.; BAHR, G. M.; SATTAR, M. A. BEHBEHANI, K.; YOUNG, D. B.; MEHLERT, A.; VAN-EMBDEN, J. D. A.; HAY, F. C.; ISENBERG, D. A.; LYDYARD, P. M. Elevated IgG antibody levels to the Mycobacterial 65-kDa heat-shock protein are characteristics of patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 30. p. 519-527. 1989.
- TURESSON, C. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Annals of Rheumatic Diseases**. v. 62. n. 8. p. 722-727. 2003.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Healthy People 2010: **Understanding and Improving Health**. 2nd ed. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2000.
- VAN DEN ENDE, C. H. M. VLIET VLIELAND, T. P. M.; MUNEKE, M. W.; HAZES, M. W. Dynamic exercise therapy in rheumatoid arthritis: A systematic review. **British Journal of Rheumatology**. v. 37. p. 677-687. 1998.
- VAN EDEN, W., THOLE, J. E.; VAN DER ZEE, R.; NOORDZIJ, A.; VAN EMBDEN, J. D.; HENSEN, E. J.; COHEN, I. R.. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. **Nature**. v. 331. p.171. 1988.

VICENZINO, B.; COLLINS, D.; WRIGHT, A. The initial effects of a cervical spine manipulative physiotherapy treatment on the pain and dysfunction of lateral epicondylalgia. **Pain**. v. 68. p. 69-74. 1996.

VIEIRA, S. **Estatística Experimental**. São Paulo: Atlas, 1989.

VINGSBO, C; SAHLSTRAND, P; BRUN, J. G.; JONSSON, R.; SAXNE, T.; HOLMDAHL, R. Pristane-induced arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non- major histocompatibility complex genes. **American Journal of Pathology**. v.149. p. 1675-1683. 1996.

VLIELAND, T. P. M. Rehabilitation of people with rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 17. n. 5. p. 847-861. 2003.

YOSHINARI, N. H.; BONFÁ, E. S. D. O. **Reumatologia para o Clínico**. São Paulo: Editora Rocca, 2000.

YOSHINO, S.; CLELAND, L.G. Depletion of alpha/beta T cells by a monoclonal antibody against the alpha/beta T cell receptor suppresses established adjuvant arthritis, but not established collagen-induced arthritis in rats. **Journal of Experimental Medicine**. v. 1. n. 175. p. 907-15. 1992.

YU, Y. C.; KOO, S. T.; KIM, C. H.; LYU, Y.; GRADY, J. J.; CHUNG, J. M. Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 115. p. 107-113. 2002.

WAKSMAN, B. H. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 56. p. 12. 2002.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **International Journal of Cardiology**. v. 85. p. 89-99. 2002.

WATKINS, K. W. Age, pain and coping with rheumatoid arthritis. **Pain**. v. 82. p. 217-228, 1999.

- WAUBEN, M.; WAGENAAR-HILERS, J. P. A.; WAN EBEN, W. Adjuvant Arthritis. **Autoimmune diseases models: a guide book**. Chapter.13. p.211-216. 1994.
- WHITEHOUSE, M. W. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, “ Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants”. **Inflammation Research**. v. 56. p. 133-138. 2007.
- WHITEHOUSE, D. J.; WHITEHOUSE, M. W.; PEARSON, C. M. Passive Transfer of Adjuvant-induced Arthritis and Allergic Encephalomyelitis in Rats using Thoracic Duct Lymphocytes. **Nature**. v. 224. p. 1322. 1969.
- WHITEHOUSE, M. W.; ORR, K. J.; BEEK, W. J.; PEARSON, C. M. Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvanticity in rats to vehicle composition. **Immunology**. v. 27. n.2. p. 311-30. 1974.
- WILSON, A. W.; MEDHURST, S. J.; DIXON, C. I.; BONTOFT, N. C.; WINYARD, L. A.; BRACK-ENBOROUGH, K. T.; ALBA, J. D.; CLARKE, C. J.; GUNTHORPE, M. J.; HICKS, G. A. An animal model of chronic inflammatory pain: Pharmacological and temporal differentiation from acute models. **European Journal of Pain**. v. 10. p. 537-549. 2006.
- WORK GROUP RECOMMENDATIONS: 2002 Exercise and Physical Activity Conference, St Louis, Missouri. **Arthritis and Rheumatism** (Arthritis Care and Research). v. 49. n. 3. p. 453-454. 2003.
- ZHANG, L; MIA, M. Y.; HOSSAIN, M. A.; YAMASAKI, F.; AGA, O. KOHASHI, O. The preventive effects of incomplete Freund's adjuvant and other vehicles on the development of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats. **Immunology**. v. 98. p. 267-272. 1999.
- ZHENG, C.; HOSSAIN, A.; KUKITA, A.; OHKI, K.; SATOH, T; KOHASHI, O. Complete Freund's Adjuvant suppresses the development and progression of Pristane-induced arthritis in rats. **Clinical Immunology**. v. 103. n. 2. p. 204-209. 2002.