



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

ELOÁ FERREIRA YAMADA

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA *SIDA TUBERCULATA*
NA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIODOACETATO DE SÓDIO EM
JOELHO DE RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Uruguaiana - RS, Brasil

2019

ELOÁ FERREIRA YAMADA

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA *SIDA TUBERCULATA*
NA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIODOACETATO DE SÓDIO EM
JOELHO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (Unipampa), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Uruguaiana - RS, Brasil

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

- Y19e Yamada, Eloá Ferreira
Efeitos do Laser de Baixa Intensidade e da Sida
tuberculata na Osteoartrite Induzida por Monoiodoacetato de
Sódio em Joelho de Ratos / Eloá Ferreira Yamada.
186 p.
- Tese (Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2019.
"Orientação: Morgana Duarte da Silva".
1. Osteoartrite de Joelho. 2. Laser de Baixa Intensidade.
3. Sida tuberculata. 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação. I.
Título.

ELOÁ FERREIRA YAMADA

EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA *SIDA TUBERCULATA*
NA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIODOACETATO DE SÓDIO EM
JOELHO DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (Unipampa), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Tese defendida e aprovada em 12 de julho de 2019.

Banca examinadora:



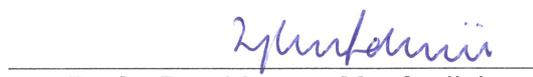
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
(UFSC – PPG Neurociências)



Profa. Dra. Chella Denise Ottonelli Stopiglia
(Unipampa – PPG Ciência Farmacêuticas)



Profa. Dra. Cristiane Casagrande Denardin
(Unipampa – PPG Bioquímica)



Profa. Dra. Vanusa Manfredini
(Unipampa – PPG Bioquímica)



Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva
(Unipampa – PPG Bioquímica)
(Presidente/Orientador)

DEDICATÓRIA

Às três pessoas mais importantes da minha vida,
meu esposo, Renato,
e meus filhos, Maurício e Pedro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Renato, pelo seu amor, dedicação, empenho e paciência. Seu apoio e incentivo incondicionais me fizeram alçar voos mais altos na busca desse sonho.

À minha super torcida Maurício e Pedro, sempre prontos para me auxiliar durante toda jornada.

À minha torcida “da vida toda”, meus pais Cyro e Vilma, meu irmão Vinícius, meus tios Nelson, Inah, Fausto e Regina, meus sogros Sr. Paulo e D. Elsa, e meus cunhados Bruno, Amanda e Junior.

À Profa. Morgana, minha querida amiga, agradeço por embarcar comigo, nessa bela aventura da aprendizagem, por compreender minhas dificuldades e ansiedades, e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao Prof. Vanderlei, pela acolhida no mundo da “Bioquímica” e por seu inestimável apoio.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, pela disponibilidade de passar seus conhecimentos, e se dispuseram em responder meus questionamentos.

Aos amigos Luísa, Camila, Matheus, Caroline, Leandro, Willian, Juliana, Daniel e Rafael, que muito me motivaram e auxiliaram na realização do trabalho.

Aos amigos do “Lab. 403”: Andréia, Aline, Débora, Marianne, Matheus, Márcio e Hemerson, pelos preciosos conhecimentos e parceria na bancada.

À Profa. Pâmela Carpes, pela assistência no desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Bruno dos Anjos e à Vanessa Mendes, pelos conhecimentos e ajuda no trabalho.

Ao Prof. Rafael Roehrs e à Bruna Ramborger, pela disponibilidade e colaboração.

Ao Prof. Edward Pessano por todo apoio e incentivo.

À Marciana Demarchi, pelo modo prestativo e eficiente que sempre atendeu às minhas necessidades.

À Profa. Franciane Bobinski (UNISUL), Prof. Daniel Martins (UNISUL) e Juliete Palandi (UDESC) pela acolhida e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Rafael Noal Moresco e à Carolina Stein (UFSM), pelo auxílio nas análises.

À minha amiga Chiara, por sua importante contribuição, paciente trabalho de revisão e refinamento dos manuscritos.

Às minhas queridas amigas Anelise, Daniela, Eloá e Lisandra, pela compreensão das minhas aflições e pelos momentos de alegria ao longo dessa caminhada.

Toda a ciência começa como filosofia e termina em arte.

Will Durant (1885-1981)

RESUMO

A osteoartrite (OA) de joelho é uma doença crônica e degenerativa, que provoca dor, edema, limitações de movimento, e elevada prevalência em idosos, principalmente em países em desenvolvimento. Do ponto de vista clínico, o tratamento da OA baseia-se na utilização de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais e corticoides, que podem ou não estar associado a tratamento fisioterapêutico, porém o uso desses medicamentos pode causar efeitos adversos importantes. Nesse contexto, o uso do Laser de Baixa Intensidade (LBI) e de plantas medicinais, tal como a *Sida tuberculata*, para o tratamento da OA, podem ser alternativas promissoras como terapia. Dessa forma, este trabalho investigou os efeitos da terapia LBI, da *S. tuberculata* e da associação dessas, no modelo de OA induzida por monoiodoacetato de sódio (MIA) em joelho de ratos, através da avaliação dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios. Inicialmente, foram estudadas diferentes doses de MIA para indução de OA de joelho. Os resultados indicaram que a maior dose de MIA estudada (1,5mg) provocou o aumento dos danos por estresse oxidativo e diminuição da defesa antioxidante, tanto no foco da lesão como em locais distantes, além disso, induziu processo inflamatório e lesões na cartilagem articular similares aos encontrados na OA de humanos. Uma vez estabelecida a dose mais efetiva de MIA, foram analisados os efeitos da terapia LBI na OA de joelho, no qual verificou-se uma redução significativa dos níveis dos marcadores de estresse oxidativo e um aumento da atividade antioxidante, tanto no local da lesão como em locais distantes, sugerindo um efeito local com consequências sistêmicas ou um possível efeito sistêmico. O Laser também atenuou o processo inflamatório, através do alívio de dor, da redução do edema e de atividade de neutrófilos no joelho. Posteriormente, foram analisados os efeitos da infusão de *S. tuberculata* na OA. A infusão promoveu uma redução dos marcadores de estresse oxidativo no soro sanguíneo, da hipersensibilidade, da atividade neutrófila no lavado e um aumento da atividade sérica. Em análises adicionais foram encontrados baixos níveis de toxicidade da *S. tuberculata* em amostras de soro, fígado e rim. Por fim, foi investigada a eficácia de ambos os tratamentos e de sua associação na OA de

joelho. Os resultados demonstraram que a associação de terapias não potencializou o efeito, apesar de ambas terem reduzido os marcadores de inflamação e de estresse oxidativo. Por outro lado, a aplicação da terapia Laser apresentou uma redução estatisticamente significativa dos marcadores bioquímicos e inflamatórios relacionados à OA, em detrimento ao tratamento com *S. tuberculata*. Assim, o Laser mostrou-se como uma terapia extremamente promissora para o tratamento dessa degeneração. Desta forma, investigações adicionais, analisando outros efeitos do Laser e de *S. tuberculata* e aprofundando seus mecanismos de ação, podem avançar ainda mais a fronteira do conhecimento no que tange aos processos inflamatório e osteoartrítico.

Palavras-chave: Osteoartrite de Joelho. Laser de Baixa Intensidade. *Sida tuberculata*. Estresse Oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

Knee Osteoarthritis (OA) is a chronic and degenerative disease, which causes pain, edema, movement limitations, with high occurrence in the elderly, especially in developing countries. From a clinical point of view, OA treatment is based on the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids, which may or may not be associated with physiotherapeutic treatment; however, the use of these drugs may cause significant adverse effects. In this context, the use of Low Intensity Laser Therapy (LILT) and medicinal plants, such as *Sida tuberculata*, for the treatment of OA may be a promising alternative as therapy. Thus, this research investigated the effects of LILT, *S. tuberculata*, and the association of both, in the model of OA induced by monosodium iodoacetate (MIA) in the knee of rats, through the evaluation of biochemical and inflammatory parameters. Initially, different doses of MIA were studied for the induction of knee OA. The results indicated that the higher dose of MIA studied (1.5mg) caused increased oxidative stress damage and decreased antioxidant defense, both in the focus of the lesion and in distant sites. In addition, it induced an inflammatory process and lesions in the articular cartilage similar to those found in human OA. Once the most effective dose of MIA was established, the effects of LILT on knee OA were analyzed, in which there was a reduction in the levels of oxidative stress markers and an increase in antioxidant activity, both at the site of the lesions and in distant sites, suggesting a local effect with systemic consequences or a possible systemic effect. The laser treatment also attenuated the inflammatory process by relieving pain, reducing edema and neutrophil activity in the knee. Subsequently, the effects of *S. tuberculata* infusion on OA were analyzed. The infusion promoted a decrease in oxidative stress markers on blood serum, lower hypersensitivity, decrease neutrophil activity in intra-articular lavage and an increase activity in blood serum. Additional analyzes found low levels of *S. tuberculata* toxicity in blood serum, liver and kidney samples. Finally, the efficacy of both treatments and their association in knee OA was investigated. The results demonstrated that the combination of therapies did not produce the expected effect, although both reduced the markers of inflammation and oxidative stress. On the other hand, the application of Laser therapy presented a statistically significant reduction of the biochemical and

inflammatory markers related to OA, in detriment to the treatment with *S. tuberculata*, Thus, Laser has showed to be an extremely promising therapy for the treatment of this degeneration. In this way, additional investigations, analyzing other effects of Laser and *S. tuberculata* and deepening the comprehension of their mechanisms of action, can further advance the frontier of knowledge regarding the inflammatory and osteoarthritic processes.

Keywords: Knee Osteoarthritis. Low Intensity Laser Therapy. *Sida tuberculata*. Oxidative Stress. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação do joelho saudável e o joelho com OA (espessamento da cápsula articular, sinovite, osteófitos, fibrilação da cartilagem e diminuição do espaço articular).....	23
Figura 2 – Esquema da via glicolítica e atuação de modo irreversível do monoiodoacetato de sódio (MIA) na enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.....	27
Figura 3 – Interações do laser e do tecido biológico – absorção, dispersão, transmissão e reflexão.....	30
Figura 4 – Equipamento de laser utilizado no presente trabalho (Laserpulse lbramed@ - Caneta 904 nanômetros).....	31
Figura 5 – <i>Sida tuberculata</i> , conhecida popularmente como guanxuma.....	34
Figura 6 – Constituintes químicos obtidos de extratos de <i>S. tuberculata</i>	35
Figura 7 – O manuscrito 1 foi publicado no <i>International Journal of Rheumatic Diseases</i>	42
Figura 8 – O manuscrito 2 foi submetido ao <i>Journal of Biophotonics</i>	55
Figura 9 – O manuscrito 3 foi submetido ao <i>Journal of Ehtnopharmacology</i>	97
Figura 10 – O manuscrito 4 será submetido ao <i>Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology</i>	128
Figura 11 – A) OA induzida pelo MIA (estresse oxidativo, citocinas e óxido nítrico). B) OA após o tratamento com Laser de Baixa Intensidade e extrato aquoso de <i>S. tuberculata</i>	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20HE – 20-hidroxiectidisona

3Rs – *Replacement, Reduction and Refinement* (Substituição, Redução e Refinamento)

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

Ca²⁺ – íon cálcio

CAT – catalase

CFA – *Complete Freund's Adjuvant* (Adjuvante Completo de Freund)

CuZnSOD – superóxido dismutase cobre-zinco dependente

ERO – espécies reativas de oxigênio

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPx – glutaciona-peroxidase

GR – glutaciona-redutase

H⁺ – íon hidrogênio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-10 – interleucina 10

IL-6 – interleucina 6

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

Laser – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação)

LBI – Laser de Baixa Intensidade

MIA – monoiodoacetato de sódio

MMP – metaloproteinases

MnSOD – superóxido dismutase manganês dependente

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NF- κ B – fator de transcrição nuclear – kappa B, *nuclear factor- κ B*

NO – óxido nítrico

NOx – nitrito/nitrato

O₂ – oxigênio

OA – osteoartrite

Pi – fósforo inorgânico

SBR – Sociedade Brasileira de Reumatologia

SOD – superóxido dismutase

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

WALT – *World Association of Laser Therapy* (Associação Mundial de Laserterapia)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1.	APRESENTAÇÃO.....	18
2.	INTRODUÇÃO.....	20
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1.	Osteoartrite.....	22
3.1.1.	Estresse Oxidativo na Osteoartrite.....	23
3.1.2.	Inflamação na Osteoartrite.....	24
3.2.	Modelo de Osteoartrite utilizando Monoiodoacetato de Sódio (MIA).....	25
3.3.	Tratamentos da Osteoartrite.....	29
3.3.1.	Terapia com Laser de Baixa Intensidade na Osteoartrite.....	30
3.3.2.	Terapia com Plantas Medicinais na Osteoartrite.....	33
4.	JUSTIFICATIVA.....	38
5.	OBJETIVOS.....	40
6.	RESULTADOS.....	42
6.1.	Manuscrito 1.....	42
6.2.	Manuscrito 2.....	55
6.3.	Manuscrito 3.....	97
6.4.	Manuscrito 4.....	128
7.	DISCUSSÃO.....	166
8.	CONCLUSÕES.....	170
9.	PERSPECTIVAS.....	172
	REFERÊNCIAS.....	174
	ANEXO.....	186

1. APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi organizado da seguinte forma: Introdução; Referencial Teórico; Justificativa; Objetivos; Resultados; Discussão; Conclusões; Perspectivas; Referências Bibliográficas; e Anexo.

Os Resultados são apresentados nos capítulos: Manuscritos 1, 2, 3 e 4. O Manuscrito 1 foi publicado na *International Journal of Rheumatic Diseases*, O Manuscrito 2 foi submetido ao *Journal of Biophotonics*. O Manuscrito 3 foi enviado para *Journal of Ethnopharmacology*. E o Manuscrito 4, será submetido à *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Cada um deles contempla as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e suas respectivas Referências.

Ressalta-se que as Referências Bibliográficas, ao final do trabalho, contemplam apenas as citações apresentadas na estrutura da tese, uma vez que os Manuscritos tem suas referências apresentadas na sua própria composição.

No Anexo, consta a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa.

2. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença crônica e degenerativa que leva a incapacidade funcional e reduz a qualidade de vida do indivíduo (Zhang *et al.*, 2010), uma vez que provoca alterações teciduais e comportamentais, como dor, e perda ou redução da função articular. Essa doença é caracterizada pelo desgaste da cartilagem articular e degeneração do osso subcondral, diminuição do espaço articular e formação de osteófitos marginais na articulação (Cifuentes *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2012; Bublitz *et al.*, 2014).

Em decorrência da intensa solicitação biomecânica nas atividades diárias e/ou desportivas, e da influência da descarga de peso corporal associado à obesidade, o joelho torna-se uma das articulações mais acometidas pela OA (Zhang e Jordan, 2010; Muraki *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017). Clinicamente, os pacientes portadores de OA de joelho fazem uso de tratamento medicamentoso com corticoides e anti-inflamatórios não esteroidais, associado ao tratamento fisioterapêutico. Na Fisioterapia, a terapia Laser de Baixa Intensidade (LBI) é uma das alternativas para o tratamento de OA de joelho, uma vez que estimula a atividade celular de reparação da cartilagem e a síntese de colágeno, acelerando a degradação da cartilagem destruída por colagenase e estimulando a síntese de fibroblastos para cicatrização (Mangueira *et al.*, 2015).

Outras alternativas para redução dos sinais e sintomas causados pela OA é a utilização de plantas medicinais. As plantas medicinais apresentam muitos efeitos terapêuticos e são de baixo custo. Dentre a extensa lista de plantas medicinais, podem-se citar espécies do gênero *Sida*, que tem sido estudadas por sua eficácia na redução dos processos inflamatórios, capacidade antioxidante (Narendhirakannan e Limmy, 2012), e antifúngica (Da Rosa *et al.*, 2015). Dentro das espécies do gênero *Sida*, a *Sida tuberculata*, popularmente conhecida como guanxuma, apresenta atividades antioxidante, antimicrobiana e antinociceptiva (Da Rosa *et al.*, 2015; Da Rosa *et al.*, 2016; Da Rosa *et al.*, 2019).

Considerando os efeitos benéficos isolados da terapia LBI e da *S. tuberculata* isoladamente, sugere-se que a associação dos mesmos pode ser ainda mais eficaz

para diminuir as alterações teciduais e comportamentais encontradas na OA. Além disso, esse tratamento pode ser uma alternativa de baixo custo para aliviar o quadro álgico, melhorar a funcionalidade e a qualidade de vida de portadores de OA de joelho.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Osteoartrite

A OA é uma das doenças crônicas mais comuns e uma das principais causas de dor e incapacidade entre adultos (Xia *et al.*, 2014; Allen e Golightly, 2015). Alguns fatores como idade avançada, sexo feminino, sobrepeso e obesidade, lesão e uso repetitivo das articulações, densidade óssea, fraqueza muscular e frouxidão articular desempenham um papel importante no desenvolvimento da OA. Essa doença acomete particularmente as articulações que suportam maior descarga de peso, como quadril e joelho (Zhang *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017).

Durante o processo de instalação e progressão da OA, os estímulos mecânicos e químicos exercidos na cartilagem articular reduzem as atividades celulares dos condrócitos, induzindo a produção de fatores catabólicos [como citocinas, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases (MMP)] (Wang *et al.*, 2014; Nirmal *et al.*, 2017), além da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Yui *et al.*, 2016).

A associação dos fatores catabólicos e de ERO aceleram a progressão da OA, caracterizada por amolecimento, fibrilação, ulceração, degeneração da cartilagem articular, além de sinovite, esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos (Figura 1) (Pelletier *et al.*, 2001; Henrotin *et al.*, 2005; Lepetsos e Papavassiliou, 2016; Yui *et al.*, 2016).

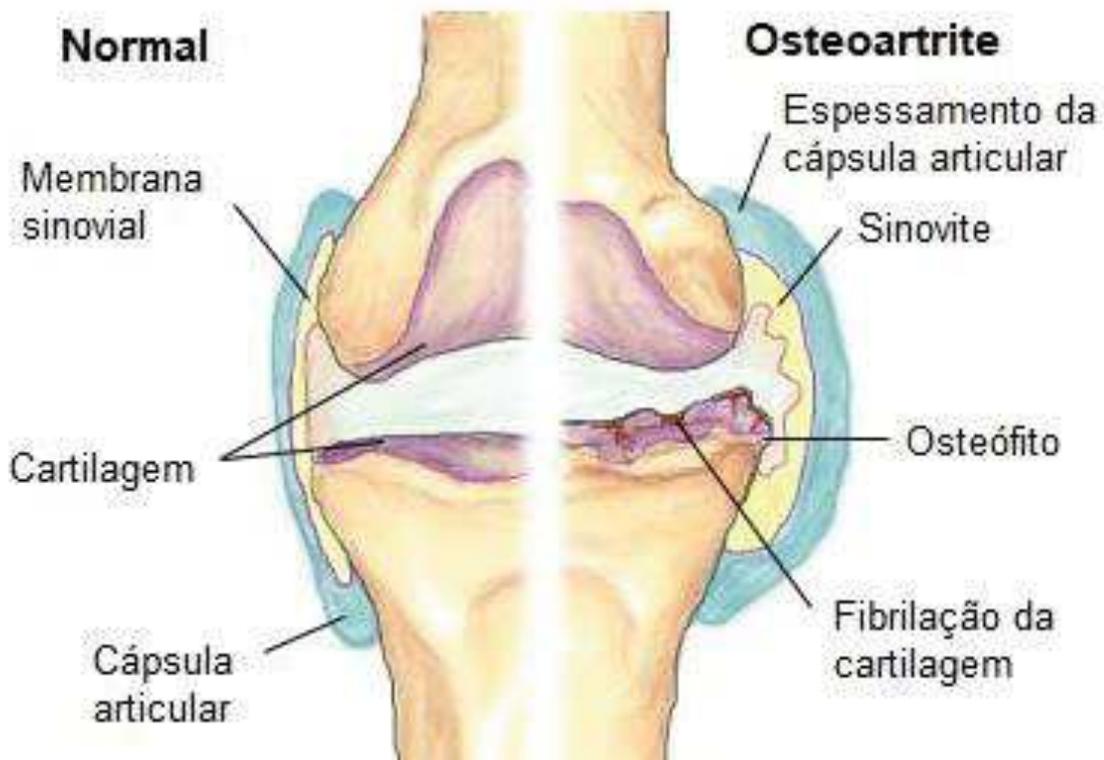


Figura 1 – Comparação do joelho saudável e o joelho com OA (espessamento da cápsula articular, sinovite, osteófitos, fibrilação da cartilagem e diminuição do espaço articular).

Fonte: Adaptado de <http://acu-clinic.com/video/knee-pain-scalp-acupuncture/> (acesso em 06/06/2019).

3.1.1. Estresse Oxidativo na Osteoartrite

Denomina-se estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e de antioxidantes. Esse processo está envolvido no desenvolvimento e progressão de doenças como a OA. As ERO são geradas continuamente nas células e na matriz extracelular. As ERO são capazes de se oxidar e, posteriormente, danificar numerosos componentes da articulação, incluindo colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico. A produção excessiva de ERO também pode desencadear a cascata inflamatória e aumento de MMP, que são fatores importantes no processo de degradação da cartilagem (Ostalowska *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não enzimático e/ou enzimático, representado por enzimas como a

superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-peroxidase (GPx) e glutationa-redutase (GR) (Salvador e Henriques, 2004). Há várias formas de SOD, que diferem em estrutura, distribuição e no metal ligado a elas, sendo as mais comuns apresentam ligação com cobre, zinco e manganês. A forma que contém cobre e zinco é denominada de superóxido dismutase cobre-zinco dependente (CuZnSOD), ocorre no citosol e em outros compartimentos celulares e não tem sua atividade afetada pelo estresse oxidativo. A SOD dependente do manganês (MnSOD) ocorre exclusivamente na matriz mitocondrial e possui maior atividade em condições de estresse (Babior, 1997; Gutteridge e Halliwell, 2000). A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio, e apresenta-se diminuída na OA. Essa diminuição de SOD associada a um aumento na produção de óxido nítrico (NO) causa apoptose de condrócitos, devido à disfunção mitocondrial (Regan *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2012). Dessa forma, o aumento do estresse oxidativo, torna os condrócitos mais suscetíveis à morte celular (Carlo e Loeser, 2003; Moon, S. J. *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente relacionados na progressão de OA. A elevada produção de ERO pode iniciar uma cascata de sinalização pró-inflamatória. As células inflamatórias podem estimular a liberação de enzimas (proteases neutras, elastase, colagenase, hidrolases ácidas, fosfatases, lipases, etc.), espécies reativas (superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, hipocloroso, ácido cítrico, etc.), e mediadores químicos (componentes eicosanoides, citocinas, quimiocinas, NO, etc.). Desse modo, células inflamatórias também contribuem para induzir o estresse oxidativo e o dano tecidual (Biswas, 2016; Nirmal *et al.*, 2017).

3.1.2. Inflamação na Osteoartrite

O processo inflamatório é uma importante fonte de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. A sinovite, inflamação que ocorre na OA, é bem caracterizada e as células sinoviais produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas [como a interleucina 1 beta (IL-

1 β) e interleucina 6 (IL-6)]. Esses mediadores inflamatórios contribuem para a patogênese da OA, por aumento da degradação da cartilagem articular e induzem hiperalgesia. O TNF- α ativa neurônios sensoriais e contribuem para as reações da cascata inflamatória através da produção de interleucinas. A IL-1 β participa no desenvolvimento de inflamação sistêmica e dor, através da ativação da ciclooxigenase-2. A IL-6 tem papel importante na patogênese da OA, pois estimula a produção de MMP-1, que por sua vez, influencia na lesão da cartilagem (Alves *et al.*, 2013; Kim e Kim, 2013b). Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10), possuem a função de limitar as respostas inflamatórias (Kim e Kim, 2013b; Neves *et al.*, 2017).

Embora a degeneração da cartilagem na OA tenha sido descrita em mamíferos, em múmias egípcias e nos dinossauros, sua etiologia exata não está totalmente esclarecida (Pelletier *et al.*, 2001). O conhecimento atual sobre o papel do estresse oxidativo e da inflamação no processo da OA permitem explorar estratégias terapêuticas, que sejam clinicamente eficazes para retardar a progressão desta doença (Pelletier *et al.*, 2001; Yui *et al.*, 2016).

3.2. Modelo de Osteoartrite utilizando Monoiodoacetato de Sódio (MIA)

Em modelos experimentais, a indução de OA de joelho pode ser realizada através de protocolos cirúrgicos (meniscectomia total ou parcial, dissecação de ligamentos colateral medial e/ou lateral, transecção de ligamentos cruzado anterior ou posterior, patelectomia, osteotomia, etc), ou químicos (por meio da injeção intra-articular). A indução de OA por protocolos químicos apresenta vantagens, uma vez que são de fácil execução, há necessidade de procedimentos minimamente invasivos e é rápida progressão (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014; Pitcher *et al.*, 2016).

O modelo de indução de OA por MIA é bem estabelecido e apresenta semelhanças à OA humana, evidenciada pela presença de hipersensibilidade e alterações histológicas (Bove *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2012; Lampropoulou-

Adamidou *et al.*, 2014; Pitcher *et al.*, 2016). O MIA é um composto administrado por injeção intra-articular, que é absorvido por condrócitos e atua inativando de forma irreversível a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Sabri e Ochs, 1971). Essa enzima (GAPDH) participa da glicólise para a formação do piruvato, que posteriormente através do ciclo de Krebs produz adenosina trifosfato (ATP), sendo esta, fonte de energia das células. Na presença de MIA, o resíduo de cisteína essencial do centro ativo de GAPDH forma uma ligação de tioéster com o iodoacetato e, portanto, não pode reagir com o substrato fisiológico de gliceraldeído-3-fosfato. Como consequência, o GAPDH é inativado após a exposição ao iodoacetato e a glicólise é inibida, resultando em posterior morte celular (Schmidt e Dringen, 2009) (Figura 2).

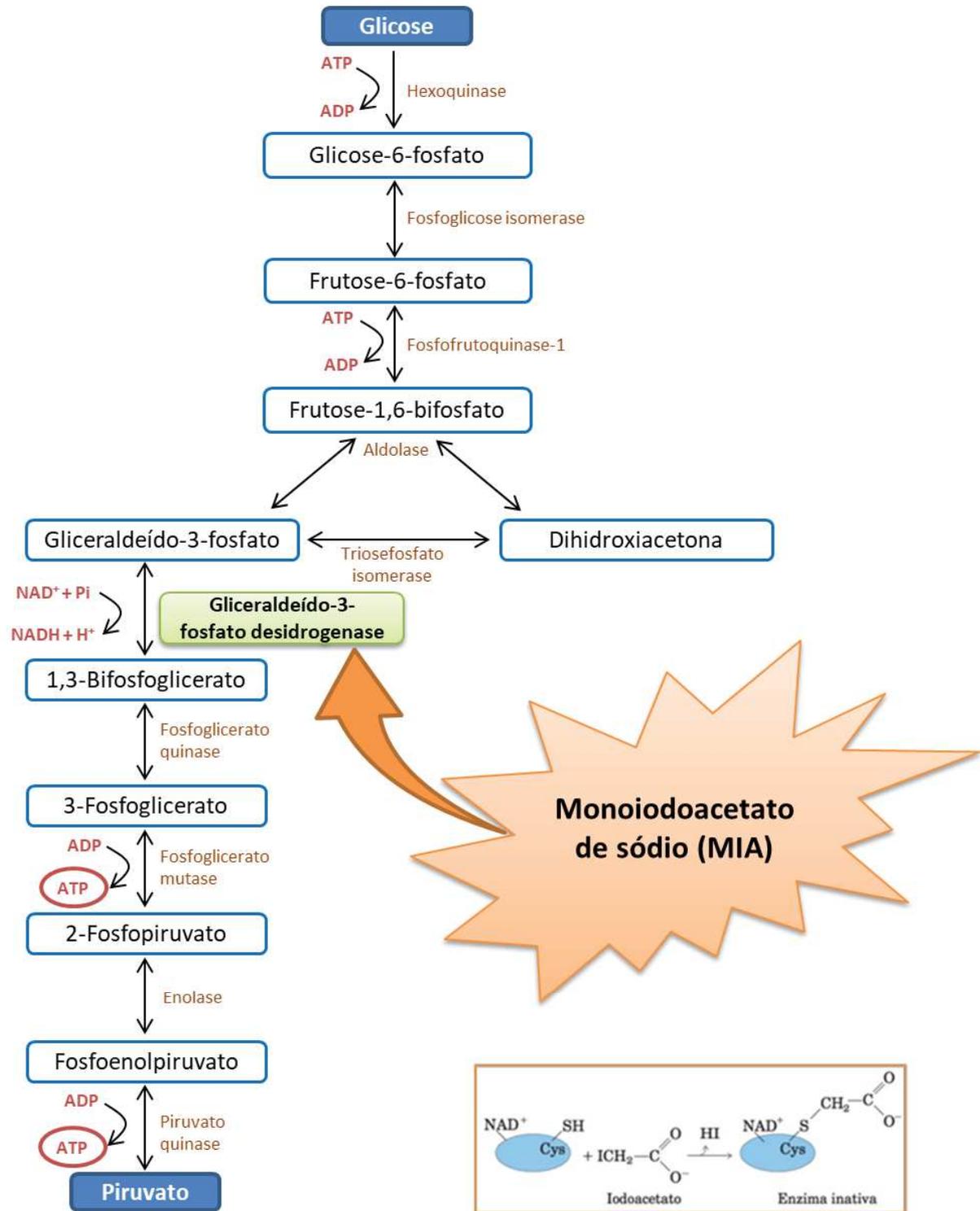


Figura 2 – Esquema da via glicolítica e atuação de modo irreversível do monoiodoacetato de sódio (MIA) na enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Siglas: ATP, adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; NAD^+ , nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado; Pi, fósforo inorgânico; $NADH$, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; H^+ , íon hidrogênio. Fonte: O autor utilizou como base o texto de Voet *et al.* (2014).

A indução de OA por MIA apresenta-se como um modelo apropriado para o estudo da dor, pois denota semelhanças às alterações histológicas, bioquímicas e

comportamentais encontradas na OA em humanos. Os estudos de dor com OA induzida por MIA em ratos tem verificado que existem diferenças na distribuição de peso corporal nas patas traseiras (Bove *et al.*, 2003; Combe *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011; Pitcher *et al.*, 2016), na hipersensibilidade mecânica (Combe *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2012; Moon, S. J. *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2015; Pitcher *et al.*, 2016), na hipersensibilidade térmica (teste de Hargreaves) (Liu *et al.*, 2011), na dor por pressão local (algésímetro Randall-Selitto) (Ahmed *et al.*, 2012), entre outros.

Além do quadro algíco, encontra-se presença de alterações inflamatórias na OA induzida por MIA, principalmente pela observação da formação de edema (Ahmed *et al.*, 2012), aumento de citocinas inflamatórias (Moon *et al.*, 2012; Moon, S. J. *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2015) e ampliação da atividade de neutrófilos na articulação (Cifuentes *et al.*, 2010).

Constatou-se ainda, que a injeção intra-articular de MIA produz degeneração progressiva da cartilagem e, posteriormente morte de condrócitos. Semelhante à OA humana há evidências de necrose de condrócitos, resultando em fibrilação da superfície e diminuição da espessura da cartilagem, separação da cartilagem necrótica do osso subjacente e exposição do osso subcondral; reduções no conteúdo e densidade mineral óssea; e presença de edema (Bove *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2003; Barve *et al.*, 2007; Neugebauer *et al.*, 2007; Cifuentes *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2012; Nagase *et al.*, 2012; Moon, S. J. *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2015). Também foram encontradas semelhanças à OA humana em registros radiográficos (Nagase *et al.*, 2012), nas alterações dos níveis de MMPs (Cifuentes *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2012; Moon, S. J. *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2015), e modificações no equilíbrio da produção de ERO e reação antioxidante na articulação do joelho (Cifuentes *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2012).

Várias doses de MIA tem sido utilizadas nos estudos pré-clínicos: 0,1mg (Bove *et al.*, 2003; Schuelert e Mcdougall, 2009), 0,3mg (Bove *et al.*, 2003; Schuelert e Mcdougall, 2009; Nagase *et al.*, 2012), 0,5mg (Pitcher *et al.*, 2016), 1mg (Guzman *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2012), 1,2mg (Cifuentes *et al.*, 2010), 2mg (Combe *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2012), 3mg (Bove *et al.*, 2003; Schuelert e Mcdougall, 2009;

Moon *et al.*, 2012; Moon, S. J. *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2015), 4mg (Liu *et al.*, 2011). Desse modo, não há um consenso sobre melhor dose para a indução de OA em joelho de ratos, que possa produzir ao mesmo tempo alterações relacionadas ao estresse oxidativo e reação antioxidante; ao processo inflamatório (dor e edema), bem como características de lesão articular.

A busca por uma dose menor de MIA para indução de OA, caracterizado por estresse oxidativo, presença de dor e danos na cartilagem articular, pode possibilitar aos animais maior bem-estar. Ao proporcionar o maior bem-estar possível para os animais e utilização de números reduzidos de animais, produzindo condições ótimas de padronização e fornecendo dados mais confiáveis para melhora da qualidade da ciência, estão em consonância aos princípios norteadores dos "3Rs" (*Replacement, Reduction and Refinement*, em uma tradução livre significa: Substituição, Redução e Refinamento) (Flecknell, 2002).

3.3. Tratamentos da Osteoartrite

As opções de tratamento para a OA dividem-se principalmente em quatro categorias principais: não farmacológica, farmacológica, complementar e alternativa, e cirúrgica. Geralmente, a indicação é que o tratamento comece com as terapias mais seguras e menos invasivas para os pacientes. Todos os indivíduos com OA devem receber pelo menos algum dos tratamentos das duas primeiras categorias e conforme sua evolução, outras categorias são indicadas posteriormente (Sinusas, 2012).

A abordagem do tratamento conservador, não farmacológico, com Fisioterapia tem como objetivos principais a melhora funcional e da qualidade de vida dos pacientes portadores de OA, atuando por meio de exercícios e de recursos eletro-termo-fototerapêuticos. Dentre os recursos fototerapêuticos, um dos mais utilizados no tratamento de OA é o Laser de Baixa Intensidade (Agne, 2013; Bannuru *et al.*, 2019).

3.3.1. Terapia com Laser de Baixa Intensidade na Osteoartrite

O acrônimo Laser é formado pelas iniciais de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, o que significa Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação. A terapia Laser tem sido utilizada com êxito em procedimentos médicos, odontológicos e fisioterapêuticos, baseando-se nas interações laser-tecido biológico. Quando um feixe de Laser incide sobre o tecido biológico, a radiação pode ser absorvida por ele, espalhada (dispersão) aos tecidos adjacentes, transmitida à tecidos mais profundos e/ou refletida para o próprio meio (Figura 3) – resultando em efeitos biológicos ou fotobioestimulatórios (Agne, 2013).

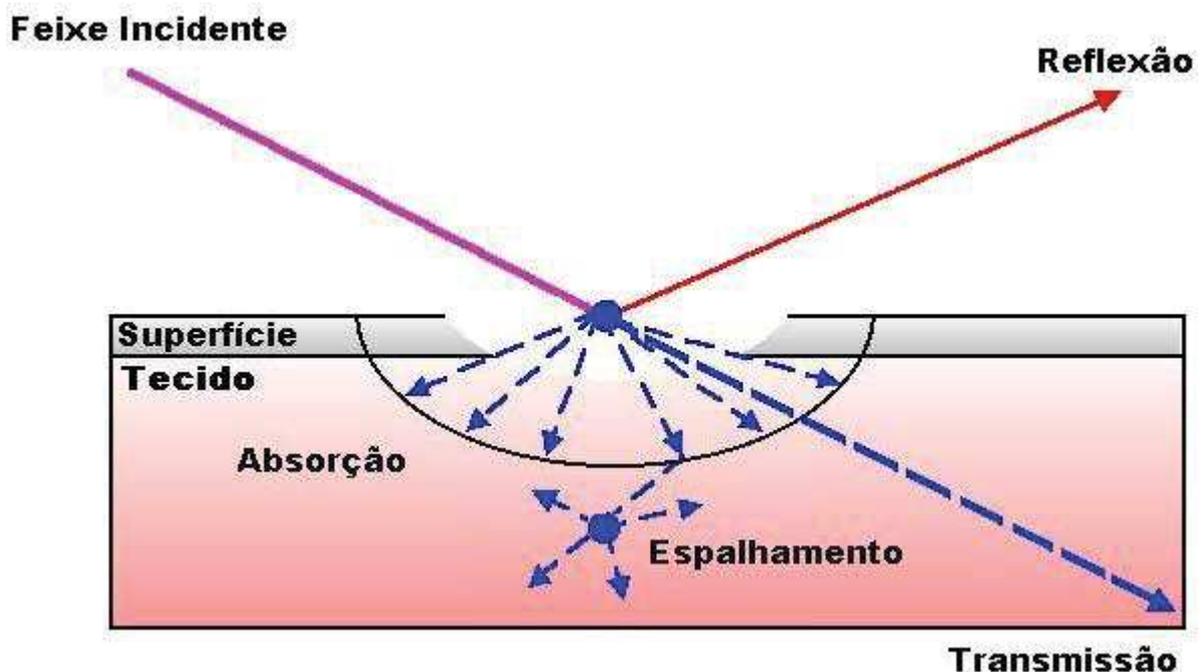


Figura 3 – Interações do laser e do tecido biológico – absorção, dispersão, transmissão e reflexão.
Fonte: Autor (2018).

As interações laser-tecido biológico dependem fundamentalmente da estrutura biológica (tipo de tecido, tamanho, espessura, coloração, composição, área exposta), bem como dos parâmetros utilizados para os tratamentos de disfunções musculoesqueléticas, como comprimento de onda, modo de entrega da radiação (contínua ou pulsada), tempo de exposição, potência, densidade de potência

(irradiância) e densidade de energia (fluência) (Salehpour *et al.*, 2018). Os efeitos fotobioestimulatórios tem sido encontrados frequentemente com Laser de baixa densidade de energia (entre 1 e 20J/cm²) e em comprimentos de onda no espectro do vermelho e do infravermelho próximo (entre 600 e 1100nm) (Huang *et al.*, 2015; Hamblin, 2017; Tsai e Hamblin, 2017; Hamblin, 2018; Salehpour *et al.*, 2018). As diretrizes da “*World Association of Laser Therapy*” (WALT) recomendam os comprimentos de onda de 780-860nm ou 904nm para o tratamento de OA de joelho (Walt, 2010a; b). Existem vários instrumentos de Laser no mercado brasileiro e a Figura 4 ilustra o equipamento utilizado no presente trabalho para o tratamento de OA de joelho dos ratos.



Figura 4 – Equipamento de laser utilizado no presente trabalho (Laserpulse Ibramed@ - Caneta 904 nanômetros).

Fonte: Google Images (2018).

A terapia LBI tem numerosos benefícios como aumento do metabolismo tecidual, redução da dor por meio da redução do processo inflamatório, diminuição da sensibilização nervosa, e aceleração do processo de regeneração (Kim e Kim, 2013a; Wang *et al.*, 2014; Milares *et al.*, 2016; Pigatto *et al.*, 2017). Em modelos de

roedores de OA de joelho, a terapia LBI, com comprimento de onda de 850nm e dose de $2,66\text{J}/\text{cm}^2$, realizado todos os dias por quatro semanas, apresentou diminuição do edema, melhora da função articular e inibição do processo de degradação da cartilagem (Moon, C. H. *et al.*, 2014). Ainda com o Laser de 850nm e dose de $3,6\text{J}/\text{cm}^2$, com frequência de tratamento de cinco vezes por semana, durante 21 dias, constatou-se aumento do limiar nociceptivo mecânico e do tempo de retirada da pata por estímulo térmico, além de diminuição nos níveis de citocinas inflamatórias (Kim e Kim, 2013a; b). Com comprimento de onda de 830nm e dose de $4,8\text{J}/\text{cm}^2$, tratados com LBI três vezes por semana, durante oito semanas, verificou-se a redução da dor e da sinovite em ratos (Wang *et al.*, 2014). O Laser de 808nm e doses de 10 e $50\text{J}/\text{cm}^2$, por cinco dias na semana, durante três semanas, preveniu a progressão de modificações morfológicas relacionadas à lesão articular (Bublitz *et al.*, 2014). Outro estudo, com o Laser de 808nm, dose $50\text{J}/\text{cm}^2$, aplicado três vezes por semana, em 24 sessões, apresentou menor densidade de condrócitos e expressão de citocina inflamatória (IL-1 β), assim preveniu a degeneração da cartilagem articular de ratos (Milares *et al.*, 2016). Ainda com o Laser de 808nm, dose de $142,4\text{J}/\text{cm}^2$, verificou-se atenuação do processo inflamatório com diminuição de células e de citocinas inflamatórias (Alves *et al.*, 2013). Com o Laser de 810nm e fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$, cinco dias por semana, durante duas semanas, o tratamento reduziu a desorganização de condrócitos e a expressão de caspase-8 (encontrada em grande quantidade na OA e que contribui para a apoptose celular) (Lin *et al.*, 2012). Com o Laser de 890nm e dose de $4,8\text{J}/\text{cm}^2$, duas vezes/semana, por até quatro meses, os resultados não indicaram aceleração do processo de cicatrização no tecido subcondral (Bayat *et al.*, 2009; Javadieh *et al.*, 2010).

Dessa forma, pode-se verificar que ainda não há um consenso na literatura científica em relação ao comprimento de onda, nem sobre a densidade de energia do Laser no processo de OA. Embora alguns dos efeitos da terapia LBI no metabolismo tecidual tenham sido muito estudados, os mecanismos biológicos subjacentes aos efeitos fotobioestimulatórios ainda não foram completamente esclarecidos.

3.3.2. Terapia com Plantas Medicinais na Osteoartrite

O uso de plantas medicinais, muitas vezes resume-se ao único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. A utilização de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antiga quanto à espécie humana (Maciel *et al.*, 2002). As observações populares sobre a utilização e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (Maciel *et al.*, 2002).

O tratamento medicamentoso para pacientes portadores de OA é constituído em sua maioria de anti-inflamatórios, e grande parte desses fármacos exercem inúmeros efeitos colaterais que podem restringir seu uso. Uma alternativa a tais medicamentos são as plantas medicinais, que oferecem uma importante perspectiva na identificação de compostos bioativos (Marmitt *et al.*, 2015). Há vários estudos que avaliam as plantas medicinais e sua eficácia nas enfermidades reumáticas. Estes começaram a serem desenvolvidos baseados em dados etnofarmacológicos. Comparados aos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, as plantas medicinais desempenham ainda um pequeno papel no tratamento de OA (Da Rosa e Machado, 2007).

Dentre a extensa lista de plantas medicinais, podem-se citar espécies do gênero *Sida* (*S. rhombifolia* e *S. cordifolia*), que tem apresentado efeitos benéficos em processos osteoartríticos (Gupta *et al.*, 2009; Narendhirakannan e Limmy, 2012; Nirmal *et al.*, 2013; Nirmal *et al.*, 2015; Nirmal *et al.*, 2017). Os estudos com a *S. tuberculata*, outra espécie do gênero *Sida*, mostraram efeitos antioxidante, antimicrobiano e antinociceptivo (Da Rosa *et al.*, 2015; Da Rosa *et al.*, 2016; Da Rosa *et al.*, 2019). Entretanto ainda não há estudos dos efeitos da *S. tuberculata* no tratamento da OA.

3.3.2.1. *Sida tuberculata*

A *Sida tuberculata* R.E. Fries, popularmente conhecida como guanxuma, é uma planta herbácea pertencente à família *Malvaceae*, encontrada na região Sul do Brasil (Da Rosa *et al.*, 2015) (Figura 5).



Figura 5 – *Sida tuberculata*, conhecida popularmente como guanxuma.
Fonte: Da Rosa, 2013.

Na composição fitoquímica do gênero *Sida*, encontram-se flavonoides, alcaloides e ecdisteroides (Dinan *et al.*, 2001; Sutradhar *et al.*, 2007; Da Rosa *et al.*, 2015; Dinda *et al.*, 2015; Da Rosa *et al.*, 2018). Especificamente, em folhas e raízes de *S. tuberculata*, verificou-se a presença de ecdisteroides, alcaloides e flavonoide, e o 20-hidroxiecdisona (20HE) considerado o composto majoritário da *S. tuberculata* (Da Rosa *et al.*, 2015; Da Rosa *et al.*, 2019) (Figura 6).

TABLE 1 Chemical compounds identified in *Sida tuberculata* (Malvaceae) with equivalent absorbance in UV-vis maximum, $[M + H]^+$ ions, and key fragments in positive mode. Mass analyses performed by UHPLC/ESI-MS.

n°	UV vis (abs. Max.)	$[M + H]^+$ m/z	Molecular formula	MS fragments m/z	Suggested compound
1	248	643	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₂	625 $[M + H - H_2O]^+$	20-hydroxyecdysone-3-glucopyranoside
2	248	481	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	463 $[M + H - H_2O]^+$, 445 $[M + H - 2H_2O]^+$, 427 $[M + H - 3H_2O]^+$	20-hydroxyecdysone
3	250	497	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	479 $[M + H - H_2O]^+$, 463 $[M + H - 2H_2O]^+$, 445 $[M + H - 3H_2O]^+$, 427 $[M + H - 4H_2O]^+$	5,20-dihydroxyecdysone*
4	248	465	C ₂₇ H ₄₄ O ₆	447 $[M + H - H_2O]^+$, 429 $[M + H - 2H_2O]^+$	Ecdysone *
5	248	613	C ₃₂ H ₅₂ O ₁₁	481 $[M + H - \text{hexose}]^+$, 463 $[M + H - \text{hexose} - H_2O]^+$, 445 $[M + H - \text{hexose} - 2H_2O]^+$, 427 $[M + H - \text{hexose} - 3H_2O]^+$	20-hydroxyecdysone-3-deoxyhexose
6	312	595	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	449 $[M + H - C_9H_6O_2]^+$, 287 $[M + H - C_9H_6O_2 - \text{glu}]^+$	Kaempferol-3-(6-p-Coumaroyl) glucopyranoside
7	317	314	C ₁₈ H ₁₉ O ₄ N	282 $[M + H - CH_3O]^+$	N-Feruloyltyramine
8	280	189	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	171 $[M + H - H_2O]^+$	Vasidine *

Figura 6 – Constituintes químicos obtidos de extratos de *S. tuberculata*.

Fonte: Retirado de Da Rosa *et al.* (2019)

Tradicionalmente, esta planta tem sido utilizada no tratamento de hiperglicemia, hipercolesterolemia, processos de infecção e inflamação (Da Rosa *et al.*, 2015). Nos estudos *in vitro*, a *S. tuberculata* apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana, além de apresentar resposta antinociceptiva em processo inflamatório induzido em camundongos (Da Rosa *et al.*, 2015; Da Rosa *et al.*, 2016; Da Rosa *et al.*, 2019).

Outras espécies do gênero *Sida* tem apresentado efeitos benéficos no alívio de dor e na resolução do processo inflamatório. A *S. rhombifolia*, por exemplo, foi eficaz na redução do edema de pata em ratos, por meio da inibição dos mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e prostaglandina (Logeswari *et al.*, 2013). Na *S. cordifolia* constatou-se propriedades analgésicas e anti-inflamatórias em edema de pata de rato induzido por carragenina ou ácido araquidônico, através da inibição da via da ciclooxigenase (Franzotti *et al.*, 2000).

As espécies do gênero *Sida* também tem sido estudadas quanto à eficácia no tratamento de OA. Gupta *et al.* (2009) verificaram os efeitos da *S. rhombifolia* na melhora do desempenho motor, aumento da distância percorrida, bem como alterações histopatológicas em animais com OA induzida pelo Complete Freund's Adjuvant (CFA – adjuvante completo de Freund). A *S. rhombifolia* também apresentou efeitos antioxidantes na lesão induzida por CFA na pata de ratos (Narendhirakannan e Limmy, 2012). A *S. cordifolia* mostrou efeito protetor na OA de joelho induzida por colagenase tipo II, pois reduziu o edema no joelho e o volume da

pata dos ratos, diminuiu a atividade de MMP, melhorou os níveis de marcadores antioxidantes e reduziu as alterações estruturais na articulação, causadas no decorrer do processo de OA (Nirmal *et al.*, 2013; Nirmal *et al.*, 2017).

Especificamente, a *S. tuberculata* diminuiu a formação do processo inflamatório induzido por carragenina, quando administrada por via oral uma hora antes do agente flogístico. Os extratos de folhas de *S. tuberculata* (10, 30, 100 e 300mg/kg) diminuíram a nocicepção induzida por ácido acético e formalina em camundongos, sugerindo redução do processo inflamatório através de mediadores endógenos (Da Rosa *et al.*, 2019).

Assim, verifica-se que algumas espécies do gênero *Sida* tem obtido êxito como efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e também em distúrbios como a OA. Isso fornece indícios do potencial medicinal da *S. tuberculata* no tratamento da OA de joelho, com perspectivas de atenuação da dor e da inflamação, redução dos danos gerados por estresse oxidativo e de lesões na cartilagem.

4. JUSTIFICATIVA

A OA do joelho é uma doença crônica e degenerativa de grande impacto físico e social, que está associada a alguns fatores de risco, tais como: a obesidade, o gênero feminino e principalmente a idade avançada (Muraki *et al.*, 2013). Atualmente (2019), existem cerca de 29 milhões de pessoas no Brasil com idade igual ou maior que 60 anos, e estima-se que em 2060 haja mais de 73 milhões nessa faixa etária (IBGE, 2018). A *World Health Organization* (WHO) estima que 10% da população mundial com 60 anos ou mais, possuem sinais e sintomas da OA (WHO, 2003). Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), a OA representa de 30% a 40% das consultas nos ambulatórios de reumatologia e representa 7,5% de todos os afastamentos de trabalho (SBR, 2017).

A inexistência de um tratamento eficaz para OA reflete a necessidade de melhor compreensão de sua fisiopatologia. Entretanto, a realização de estudos da OA em humanos apresenta algumas limitações, tais como: lento desenvolvimento da doença, ausência de sintomas em estágios iniciais, variedade de sintomas (dor, rigidez, edema, limitação de funções), escassez da correlação entre a progressão da OA e a gravidade dos sintomas, entre outros. Portanto, o estudo de modelos de OA em animais, pode contribuir para preencher algumas lacunas para a compreensão do desenvolvimento da doença, uma vez que algumas influências ambientais são controladas, existe a possibilidade de coleta de amostras para análises de marcadores inflamatórios e de parâmetros bioquímicos de estresse, bem como permite avaliação histológica das articulações envolvidas. O modelo de OA também deve apresentar semelhanças à OA humana quanto à progressão da doença, às características de lesão na cartilagem e à presença de alterações comportamentais como a dor (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014; Pitcher *et al.*, 2016).

A dor desencadeada na OA é considerada o principal sintoma, levando à incapacidade funcional e reduzindo a qualidade de vida do indivíduo, além de provocar alterações teciduais e bioquímicas importantes (Zhang *et al.*, 2010). Embora alguns estudos evidenciem os benefícios da aplicação da terapia LBI no processo de OA (Bayat *et al.*, 2009; Javadieh *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012; Alves *et*

al., 2013; Kim e Kim, 2013a; b; Bublitz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015), ainda não há um consenso na literatura sobre os parâmetros físicos de Laser mais eficazes para o tratamento de OA. Ainda, não estão totalmente esclarecidos os mecanismos (relacionados ao estresse oxidativo e ao processo inflamatório) que explicam a interação Laser-tecido biológico, no que tange à OA.

Estudos (Franzotti *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2009; Narendhirakannan e Limmy, 2012; Logeswari *et al.*, 2013; Nirmal *et al.*, 2013; Nirmal *et al.*, 2017; Da Rosa *et al.*, 2019) indicam que as espécies do gênero *Sida* tem apresentado efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e redução das características da OA. Assim, a *S. tuberculata* pode ser benéfica no tratamento da OA de joelho, com redução de estresse oxidativo, da dor e da inflamação, e de lesões na cartilagem. De forma complementar, os efeitos terapêuticos de LBI e da *S. tuberculata* podem ser potencializados através de sua aplicação associada.

Diante do exposto, esse estudo pretende analisar os efeitos do Laser, da *S. tuberculata* e de sua associação na OA, com vistas a verificar a eficácia desses tratamentos para o alívio do quadro algico, e conseqüentemente para a melhora da qualidade de vida dos portadores de OA de joelho.

5. OBJETIVOS

Geral

Investigar o efeito da terapia Laser de Baixa Intensidade (LBI), do extrato aquoso de *S. tuberculata* e da associação desses, na OA induzida por MIA em joelho de ratos.

Específicos

- Caracterizar a dose de MIA necessária para induzir a OA na articulação do joelho de ratos, através da identificação de lesões histopatológicas, além de relacioná-los aos níveis de estresse oxidativo, dor e edema.
- Investigar o efeito da terapia LBI em ratos com OA de joelho induzida por MIA, através da observação dos seguintes parâmetros:
 - marcadores de estresse oxidativo;
 - atividade de neutrófilos;
 - hipersensibilidade e edema;
 - presença de citocinas inflamatórias.
- Investigar o efeito do extrato aquoso de *S. tuberculata* em ratos com OA de joelho induzida por MIA, através da observação dos seguintes parâmetros:
 - marcadores de estresse oxidativo;
 - atividade de neutrófilos;
 - hipersensibilidade e edema;
 - toxicidade renal e hepática.
- Investigar o efeito da associação da terapia LBI e do extrato aquoso de *S. tuberculata*, em ratos com OA de joelho induzida por MIA, através da observação dos seguintes parâmetros:
 - marcadores de estresse oxidativo;
 - marcadores inflamatórios (níveis de NO, citocinas pró e anti-inflamatórias, e presença de dor).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou uma série de resultados que foram parcialmente divididos em manuscritos. Neste trabalho, foram expostos inicialmente os resultados obtidos através do modelo de indução de OA por MIA em ratos. Neste primeiro estudo, observou-se que a maior dose de MIA estudada (1,5mg) induziu o aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo, bem como a diminuição da defesa antioxidante, tanto no foco da lesão como em locais distantes, sugerindo um possível efeito sistêmico associado à OA do joelho. Um aumento nos níveis de ERO está associado com elevada peroxidação lipídica (Ostalowska *et al.*, 2006; Paliwal *et al.*, 2013) e danos à proteínas, que também são indicadores da intensidade da atividade dos radicais livres (Tetik *et al.*, 2010). O estresse oxidativo pode contribuir com o desencadeamento da sensibilização central, através de sistemas de segundos mensageiros e/ou ativação glial, favorecendo o desenvolvimento de dor (Hulsebosch *et al.*, 2009; Sagar *et al.*, 2011; Burston *et al.*, 2013). Estudos prévios já demonstravam aumento do estresse oxidativo induzido pelo MIA (Liu *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2012; Moon, S. J. *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2015). No entanto, o presente trabalho foi o primeiro que demonstrou além dessas alterações, que o MIA produziu sinais e sintomas inflamatórios similares aos encontrados em indivíduos com OA do joelho na clínica. O processo inflamatório foi evidenciado pela presença de hipersensibilidade, edema e elevada atividade neutrófila. Na cartilagem articular, o MIA produziu danos teciduais, observados pela superfície irregular da cartilagem, adelgaçamento e áreas necróticas na região.

Uma vez estabelecida a dose de MIA que induziu sintomas e alterações biológicas similares a OA de joelho humano, nosso próximo objetivo foi verificar os efeitos da terapia LBI nesse mesmo modelo experimental. O tratamento com LBI diminuiu os níveis dos marcadores de estresse oxidativo e aumentou a atividade antioxidante em locais distantes da lesão, sugerindo um efeito local com consequências sistêmicas ou um possível efeito sistêmico específico do Laser. A ação do LBI com comprimento de onda na faixa do infravermelho em membranas de mitocôndrias e/ou de células pode influenciar a modulação das vias de sinalização,

produção de ERO, ATP, íons cálcio (Ca^{2+}), NO e fosfato (Tsai e Hamblin, 2017). Sob condições de estresse ou isquemia, a atividade da enzima citocromo c oxidase (unidade IV na cadeia respiratória mitocondrial) é inibida pelo NO, através da competição direta no centro catalítico, entre o NO e o oxigênio (O_2). A fotobioestimulação pode reverter esta inibição, dissociando o NO dos locais de ligação e aumentando as taxas de respiração celular (Karu *et al.*, 2005; Farivar *et al.*, 2014; De Freitas e Hamblin, 2016; Tsai e Hamblin, 2017). A captação de fótons pela citocromo c oxidase também promove aumento do potencial de membrana mitocondrial e reduz simultaneamente a produção de ERO (Giuliani *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013; Hamblin, 2017; 2018). A redução dos danos por estresse oxidativo em locais distantes da lesão, podem ter influenciado na atenuação da dor através da diminuição da sensibilização periférica e central (Mishra *et al.*, 2012; Paliwal *et al.*, 2012; 2013). O alívio da dor também ter ocorrido em decorrência da resolução do processo inflamatório (Alves *et al.*, 2013; Kim e Kim, 2013a; b; Wang *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2017), constatado através da diminuição da atividade neutrófila. Durante processos como a OA ocorre inflamação das estruturas articulares, especialmente da membrana sinovial (sinovite), que é uma fonte importante de mediadores inflamatórios como as citocinas. Na inflamação crônica, as citocinas favorecem o estresse oxidativo e danos articulares, e como consequência presença de dor (Ahmed *et al.*, 2012). Nos grupos que receberam terapia Laser, constatou-se uma diminuição no estresse oxidativo e aumento na atividade antioxidante, e também redução de citocinas inflamatórias quando comparado ao grupo MIA.

Seguindo a mesma linha de pesquisa com o modelo experimental de OA induzido por MIA, procurou-se posteriormente verificar o efeito do extrato aquoso de *S. tuberculata* na OA de joelho. Neste contexto, pode-se observar que os animais que foram tratados com a planta apresentaram diminuição nos níveis de marcadores de estresse oxidativo. Em estudos *in vitro* (com *Artemia salina*), os extratos hidroetanólicos de *S. tuberculata* demonstraram atividade antioxidante e efeito protetor contra danos oxidativos (Da Rosa *et al.*, 2016). O extrato aquoso de *S. tuberculata* também reduziu o processo inflamatório, pois apresentou menor atividade de neutrófilos no local da lesão e maior atividade no soro sanguíneo quando comparado ao grupo MIA. O 20HE (composto majoritário da planta) possui

propriedades anti-inflamatórias, uma vez que inibe a liberação de histamina dos mastócitos (Lafont e Dinan, 2003), além de inibir a via de sinalização do fator de transcrição nuclear – kappa B (NF- κ B) associados à redução de marcadores inflamatórios (NO, proteína C reativa, citocinas pró-inflamatórias e subunidade do fator nuclear- κ 65 p65) (Sun *et al.*, 2017). Além disso, a redução da hiperalgesia mecânica e da dor espontânea também foram encontradas no presente estudo (sendo os resultados mais expressivos com a dose de 5mg/ml). Em relação à atividade hepática e renal, o extrato aquoso de *S. tuberculata* não apresentou alterações significativas. Na avaliação de toxicidade através da análise com software especializado, o extrato de *S. tuberculata* apresentou baixa probabilidade de causar efeitos tóxicos em todos os parâmetros avaliados, sugerindo ser não-geotóxica, não-tóxica ao sistema reprodutivo, não cardiotoxicidade, não irritante, não-hepatotóxica, além de não apresentar toxicidade renal (Da Rosa *et al.*, 2016).

Na última parte desse estudo, foram verificados os efeitos isolados e associados do LBI e do extrato aquoso de *S. tuberculata* na OA do joelho induzida por MIA. Os resultados indicaram que, isoladamente, a terapia LBI e o extrato aquoso de *S. tuberculata* diminuíram os danos causados por estresse oxidativo, assim como os indicadores inflamatórios na OA do joelho. A associação de terapias foi eficaz na diminuição da dor e da inflamação, no entanto, não demonstraram alterações significantes em relação aos danos por estresse oxidativo. A terapia LBI e a *S. tuberculata* parecem interferir um no outro, anulando os efeitos benéficos relacionados aos danos por estresse oxidativo e reação antioxidante. A associação também reduziu os níveis de nitrito/nitrato (NOx) e de citocinas pró-inflamatórias no joelho lesado, entretanto não houve potencialização dos efeitos. Observou-se ainda redução da hiperalgesia mecânica e a dor espontânea, que pode ser resultado dos níveis reduzidos de citocinas inflamatórias e de NO. Assim, os resultados encontrados sugerem que as terapias combinadas são benéficas sobre os processos inflamatórios, embora não tenham sido detectados efeitos cumulativos, e também não tiveram alterações significativas nos parâmetros de estresse oxidativo. Dessa forma, a associação das técnicas não demonstrou efeitos superiores em relação ao uso isolado do tratamento com Laser ou com *S. tuberculata*.

8. CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da terapia LBI, da *S. tuberculata* e da associação desses, no modelo de OA induzida por MIA em joelho de ratos, através dos parâmetros bioquímicos (estresse oxidativo e atividade antioxidante) e inflamatórios (presença de dor e edema, atividade de neutrófilos, níveis de citocinas e NO). Inicialmente, foram estudadas diferentes doses de MIA para indução de OA de joelho. Uma vez estabelecida a dose mais efetiva de MIA, foram analisados os efeitos do LBI e, posteriormente os efeitos do extrato aquoso de *S. tuberculata* na OA de joelho. Após a obtenção das doses mais eficazes de Laser e de *S. tuberculata*, foi realizado uma análise comparativa da eficácia de ambos os tratamentos e de sua associação na OA de joelho induzida por MIA. Diante das análises realizadas, conclui-se que:

- A escolha da dose de 1,5 mg de MIA para ser injetado nos joelhos dos ratos, foi baseada nos princípios dos “3Rs” (*Replacement, Reduction and Refinement*, em português Substituição, Redução e Refinamento), para o maior bem estar dos animais e melhor padronização do processo de OA, pois essa dose induziu um desequilíbrio nos mecanismos oxidativos e antioxidativos (Figura 11A), tanto no local da lesão quanto em locais distantes, o que contribuiu para a fisiopatologia da OA. Ainda, a injeção de MIA induziu dor, edema no joelho e danos extensos à cartilagem da articulação, evidenciado histologicamente através das superfícies irregulares, adelgaçamento e áreas necróticas na cartilagem.
- A terapia Laser (18J/cm²) diminuiu os níveis de marcadores de estresse oxidativo e aumentou a atividade antioxidante em locais distantes da lesão, sugerindo um possível efeito sistêmico secundário, reduziu a dor, atividade de neutrófilos e os níveis de citocinas, indicando uma redução do progresso inflamatório através da cascata de citocinas (Figura 11B). Diante disso, a terapia LBI apresenta-se como uma técnica promissora para o tratamento da OA do joelho.
- A administração, por via oral, do extrato aquoso de *S. tuberculata* (5mg/ml) nos ratos reduziu o estresse oxidativo, diminuiu a atividade de neutrófilos e a dor devido a OA do joelho (Figura 11B), além de apresentar baixa toxicidade

hepática e renal. Assim, o extrato aquoso de *S. tuberculata* apresenta potencial medicinal para o tratamento de indivíduos portadores de OA de joelho.

- O estudo comparativo entre os efeitos da terapia LBI, do extrato aquoso da *S. tuberculata* e da associação de ambos, na OA de joelho induzida por MIA; mostrou que a terapia Laser levou a uma diminuição do estresse oxidativo e um aumento da atividade antioxidante (na lesão e em locais distantes); e também reduziu os níveis de NOx e de citocinas, contribuindo assim para uma diminuição mais significativa da hiperalgesia mecânica e da dor espontânea em comparação aos demais tratamentos. Dessa forma, a terapia LBI se mostrou mais eficaz para atenuar os sinais da OA do joelho do modelo proposto. Portanto, esse trabalho apresentou evidências adicionais para a compreensão dos mecanismos da fotobioestimulação no tecido cartilaginoso com OA, reafirmando sua importância como intervenção terapêutica benéfica para o tratamento de indivíduos com OA de joelho.

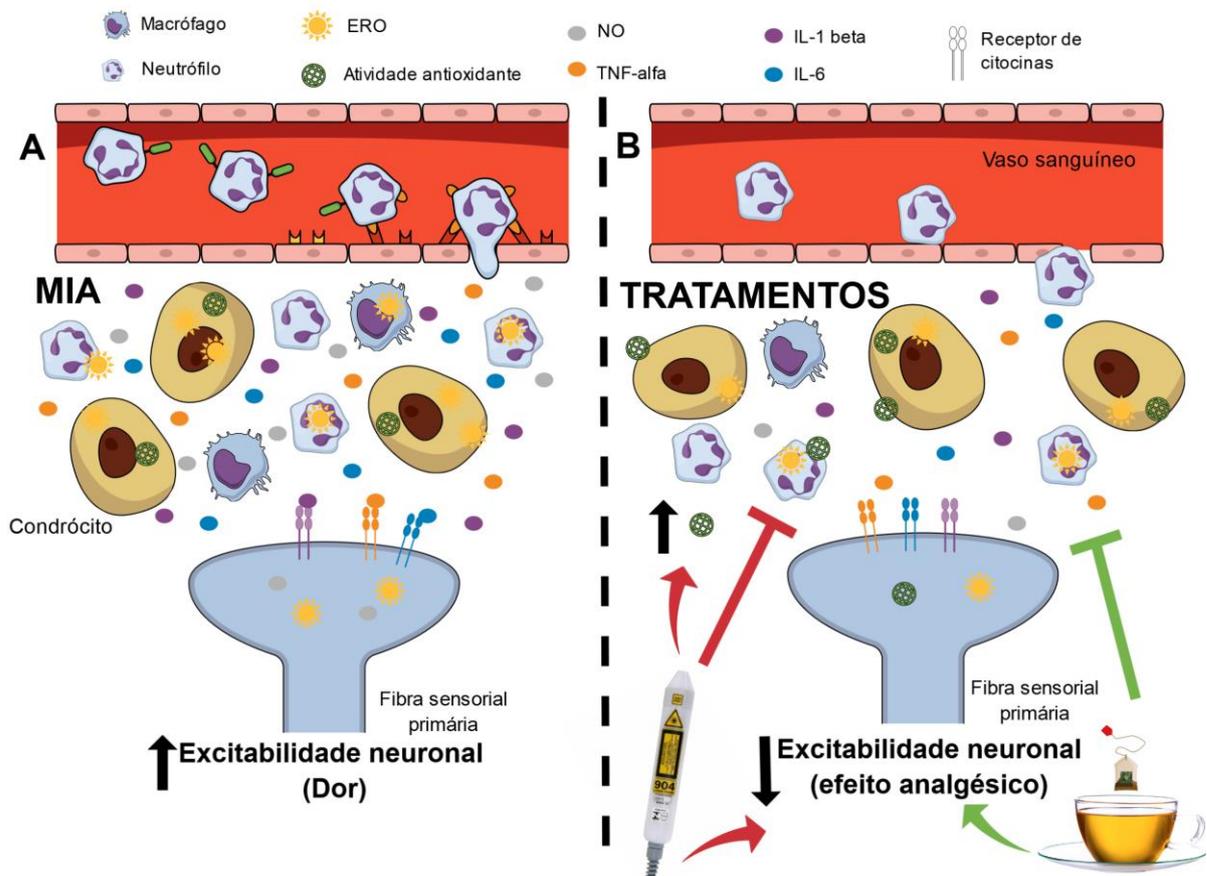


Figura 11 – A) OA induzida pelo MIA (estresse oxidativo, citocinas e óxido nítrico). B) OA após o tratamento com Laser de Baixa Intensidade e extrato aquoso de *S. tuberculata*. Siglas: ERO, espécies reativas de oxigênio; NO, óxido nítrico; TNF-alfa, fator de necrose tumoral alfa; IL-1beta, interleucina 1 beta; IL-6, interleucina 6. Fonte: Autor (2019).

9. PERSPECTIVAS

As investigações conduzidas sugerem que é possível avançar ainda mais a fronteira do conhecimento a respeito do uso da terapia LBI e da *S. tuberculata* nos processos inflamatório e osteoartrítico, pois ainda é possível explorar:

- Outras dosagens de extratos da *S. tuberculata* em modelos de OA.
- O efeito de extratos de *S. tuberculata* em outros modelos de inflamação e de dor crônica.
- A ação da terapia LBI e/ou *S. tuberculata* em processos inflamatórios, através da análise dos(as):
 - biomarcadores, como o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), o iNOS, a ciclooxigenase-2, dentre outros.
 - características histológicas, em processos agudos (hiperemia ativa patológica, edema, e infiltrado de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos) e em processos crônicos (proliferação fibroblástica e angioblástica, e infiltrado de células mononucleares, principalmente de linfócitos, plasmócitos e macrófagos).
- Os efeitos terapêuticos do LBI e/ou *S. tuberculata* em modelos de OA através do(a):
 - mecanismos apoptóticos (morte celular programada) dos condrócitos, com atenção voltada para as caspases.
 - desequilíbrio entre as MMP e seus inibidores teciduais, que resulta na destruição contínua de proteoglicanos e de colágeno da cartilagem na OA.
 - análise da ativação de células gliais e sua influência no quadro de dor causado pela OA.

- acompanhamento dos aspectos histológicos da evolução do processo de OA durante o tratamento.
- Os efeitos antinociceptivos e antioxidantes encontrados nas terapias Laser e *S. tuberculata* sugerem efeitos sobre outras disfunções, tais como distúrbios de humor e de memória, que podem ser estudados futuramente.

REFERÊNCIAS

AGNE, J. E. **Eletrotermofototerapia**. 1a. edição. O Autor, 2013.

AHMED, A. S. et al. Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. **Pain**, v. 153, n. 1, p. 18-26, Jan 2012. ISSN 1872-6623 (Electronic)
0304-3959 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018973> >.

ALLEN, K. D.; GOLIGHTLY, Y. M. State of the evidence. **Curr Opin Rheumatol**, v. 27, n. 3, p. 276-83, May 2015. ISSN 1531-6963 (Electronic)
1040-8711 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775186> >.

ALVES, A. C. et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 5, p. R116, 2013. ISSN 1478-6362 (Electronic)
1478-6354 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028507>
<https://arthritis-research.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/ar4296> >.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 2, p. 141-55, Feb 1997. ISSN 0100-879X (Print)
0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9239299> >.

BANNURU, R. R. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Jul 3 2019. ISSN 1522-9653 (Electronic)
1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31278997> >.

BARVE, R. A. et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, n. 10, p. 1190-8, Oct 2007. ISSN 1063-4584 (Print)
1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17500014> >.

BAYAT, M.; KAMALI, F.; DADPAY, M. Effect of low-level infrared laser therapy on large surgical osteochondral defect in rabbit: a histological study. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 1, p. 25-30, Feb 2009. ISSN 1557-8550 (Electronic)
1549-5418 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196107> >.

BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 5698931, 2016. ISSN 1942-0994 (Electronic)
1942-0994 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881031> >.

BOVE, S. E. et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, n. 11, p. 821-30, Nov 2003. ISSN 1063-4584 (Print)
1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609535> >.

BUBLITZ, C. et al. Low-level laser therapy prevents degenerative morphological changes in an experimental model of anterior cruciate ligament transection in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 5, p. 1669-78, Sep 2014. ISSN 1435-604X (Electronic)
0268-8921 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722775>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-014-1546-z> >.

BURSTON, J. J. et al. Cannabinoid CB2 receptors regulate central sensitization and pain responses associated with osteoarthritis of the knee joint. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80440, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282543> >.

CARLO, M. D., JR.; LOESER, R. F. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. **Arthritis Rheum**, v. 48, n. 12, p. 3419-30, Dec 2003. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673993>
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/art.11338/asset/11338 ftp.pdf?v=1&t=jdy nbief&s=b68e4d9029deddf61cbbf889d9c0d14d0b11a799> >.

CHEN, D. et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. **Bone Res**, v. 5, p. 16044, 2017. ISSN 2095-4700 (Print)
2095-4700 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28149655> >.

CIFUENTES, D. J. et al. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 8, p. 1088-95, Aug 2010. ISSN 1522-9653 (Electronic)
1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20417294> >.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? **Neurosci Lett**, v. 370, n. 2-3, p. 236-40, Nov 11 2004. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488329> >.

DA ROSA, C.; MACHADO, C. A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 1, p. 26-32, 2007.

DA ROSA, H. S. et al. Sida tuberculata extract reduces the nociceptive response by chemical noxious stimuli in mice: Implications for mechanism of action, relation to chemical composition and molecular docking. **Phytother Res**, v. 33, n. 1, p. 224-233, Jan 2019. ISSN 1099-1573 (Electronic)

0951-418X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30375066> >.

DA ROSA, H. S. et al. Ecdysteroids in Sida tuberculata R.E. Fries (Malvaceae): chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-Candida krusei activity. **Food Chem**, v. 182, p. 193-9, Sep 1 2015. ISSN 0308-8146 (Print)

0308-8146 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25842327> >.

DA ROSA, H. S. et al. Extraction optimization and UHPLC method development for determination of the 20-hydroxyecdysone in Sida tuberculata leaves. **Steroids**, v. 132, p. 33-39, Apr 2018. ISSN 1878-5867 (Electronic)

0039-128X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29408449> >.

DA ROSA, H. S. et al. Sida tuberculata (Malvaceae): a study based on development of extractive system and in silico and in vitro properties. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 8, Jul 11 2016. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27409335>
<http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v49n8/1414-431X-bjmbr-1414-431X20165282.pdf> >.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v. 22, n. 3, May-Jun 2016. ISSN 1077-260X (Print)

1077-260X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28070154> >.

DINAN, L.; BOURNE, P.; WHITING, P. Phytoecdysteroid profiles in seeds of Sida spp. (Malvaceae). **Phytochem Anal**, v. 12, n. 2, p. 110-9, Mar-Apr 2001. ISSN 0958-0344 (Print)

0958-0344 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705239>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pca.566> >.

DINDA, B. et al. The genus Sida L. - A traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. **J Ethnopharmacol**, v. 176, p. 135-76, Dec 24 2015. ISSN 1872-7573 (Electronic)

0378-8741 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497766> >.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 58-62, Spring 2014. ISSN 2008-9783 (Print)
 2008-9783 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653800> >.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. **ALTEX**, v. 19, n. 2, p. 73-8, 2002. ISSN 1868-596X (Print)
 1868-596X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12098013> >.

FRANZOTTI, E. M. et al. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **J Ethnopharmacol**, v. 72, n. 1-2, p. 273-7, Sep 2000. ISSN 0378-8741 (Print)
 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967481> >.

GIULIANI, A. et al. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. **BMC Complement Altern Med**, v. 9, p. 8, Apr 15 2009. ISSN 1472-6882 (Electronic)
 1472-6882 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368718>
<https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1472-6882-9-8> >.

GUPTA, S. R. et al. Anti-arthritis activity of various extracts of *Sida rhombifolia* aerial parts. **Nat Prod Res**, v. 23, n. 8, p. 689-95, 2009. ISSN 1478-6427 (Electronic)
 1478-6419 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19418351> >.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 136-47, 2000. ISSN 0077-8923 (Print)
 0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863535> >.

GUZMAN, R. E. et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. **Toxicol Pathol**, v. 31, n. 6, p. 619-24, Nov-Dec 2003. ISSN 0192-6233 (Print)
 0192-6233 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585729> >.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, v. 4, n. 3, p. 337-361, 2017. ISSN 2377-9098 (Print)
 2377-9098 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748217> >.

_____. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. **Photochem Photobiol**, v. 94, n. 2, p. 199-212, Mar 2018. ISSN 1751-1097 (Electronic)

0031-8655 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29164625> >.

HENROTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, n. 8, p. 643-54, Aug 2005. ISSN 1063-4584 (Print)

1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936958> >.

HUANG, Y. Y. et al. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **J Biophotonics**, v. 6, n. 10, p. 829-38, Oct 2013. ISSN 1864-0648 (Electronic)

1864-063X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23281261>

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbio.201200157> >.

HUANG, Z. et al. Effectiveness of low-level laser therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, n. 9, p. 1437-1444, Sep 2015. ISSN 1522-9653 (Electronic)

1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914044> >.

HULSEBOSCH, C. E. et al. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 202-13, Apr 2009. ISSN 0165-0173 (Print)

0165-0173 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154757> >.

IBGE, I. B. D. G. E. E. Projeções da população: Brasil e unidades da federação., April 12, 2019. 2018. Disponível em: <

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?=&t=resultados> >. Acesso em: 10th April.

JAVADIEH, F.; BAYAT, M.; TORKAMAN, G. Evaluation of low-level laser therapy with a He-Ne laser on the healing of an osteochondral defect using a biomechanical test. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 3, p. 423-8, Jun 2010. ISSN 1557-8550 (Electronic)

1549-5418 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821703> >.

JEONG, J. H. et al. Eupatilin Exerts Antinociceptive and Chondroprotective Properties in a Rat Model of Osteoarthritis by Downregulating Oxidative Damage and Catabolic Activity in Chondrocytes. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130882, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26083352>

<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0130882&type=printable> >.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surg Med**, v. 36, n. 4, p. 307-14, Apr 2005. ISSN 0196-8092 (Print)
0196-8092 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15739174>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/lsm.20148> >.

KIM, G.; KIM, E. Analgesic Efficacy of Low Intensity Laser Therapy in a Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritic Rat Model. **J Phys Ther Sci**, v. 25, n. 3, p. 309-312, 2013a.

_____. Anti-Inflammation Effects of Low Intensity Laser Therapy on Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. **J. Phys. Ther. Sci.**, v. 25, n. 2, p. 173-175, 2013b.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **J Insect Sci**, v. 3, p. 7, 2003. ISSN 1536-2442 (Electronic)
1536-2442 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15844229> >.

LAMPROPOULOU-ADAMIDOU, K. et al. Useful animal models for the research of osteoarthritis. **Eur J Orthop Surg Traumatol**, v. 24, n. 3, p. 263-71, Apr 2014. ISSN 1633-8065 (Print)
1633-8065 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508348>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00590-013-1205-2> >.

LEPETSOS, P.; PAPAVALASSILIOU, A. G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 4, p. 576-591, Apr 2016. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26769361> >.

LIN, H. D. et al. The effect of low-level laser to apoptosis of chondrocyte and caspases expression, including caspase-8 and caspase-3 in rabbit surgery-induced model of knee osteoarthritis. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 3, p. 759-66, Mar 2012. ISSN 1437-160X (Electronic)
0172-8172 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188382>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00296-010-1629-5> >.

LIU, P. et al. Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. **Neurosci Lett**, v. 493, n. 3, p. 72-5, Apr 15 2011. ISSN 1872-7972 (Electronic)
0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241772> >.

LOGESWARI, P. et al. In vivo anti-inflammatory effect of aqueous and ethanolic extract of *Sida rhombifolia* L. Root. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 1, p. 316-321, 2013.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MANGUEIRA, N. M. et al. Effect of low-level laser therapy in an experimental model of osteoarthritis in rats evaluated through Raman spectroscopy. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 3, p. 145-53, Mar 2015. ISSN 1557-8550 (Electronic) 1549-5418 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714387> >.

MARMITT, D. J. et al. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Antiinflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Rev. Fitos**, v. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.

MILARES, L. P. et al. Effectiveness of an aquatic exercise program and low-level laser therapy on articular cartilage in an experimental model of osteoarthritis in rats. **Connect Tissue Res**, v. 57, n. 5, p. 398-407, Sep 2016. ISSN 1607-8438 (Electronic) 0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27220395> >.

MOON, C. H. et al. Therapeutic effect of irradiation of magnetic infrared laser on osteoarthritis rat model. **Photochem Photobiol**, v. 90, n. 5, p. 1150-9, Sep-Oct 2014. ISSN 1751-1097 (Electronic) 0031-8655 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962501> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/php.12304> >.

MOON, S. J. et al. Ursodeoxycholic Acid ameliorates pain severity and cartilage degeneration in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. **Immune Netw**, v. 14, n. 1, p. 45-53, Feb 2014. ISSN 1598-2629 (Print) 1598-2629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24605080> <https://synapse.koreamed.org/Synapse/Data/PDFData/0078IN/in-14-45.pdf> >.

MOON, S. J. et al. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n. 11, p. 1426-38, Nov 2012. ISSN 1522-9653 (Electronic) 1063-4584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890185> >.

MURAKI, S.; TANAKA, S.; YOSHIMURA, N. Epidemiology of knee osteoarthritis. **OA Sports Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-6, 2013.

NAGASE, H.; KUMAKURA, S.; SHIMADA, K. Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-

induced osteoarthritis in rat knee. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 65, n. 1, p. 29-36, Jan 2012. ISSN 1873-488X (Electronic)
1056-8719 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037051> >.

NARENDHIRAKANNAN, R. T.; LIMMY, T. P. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Sida rhombifolia* stems and roots in adjuvant induced arthritic rats. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 34, n. 2, p. 326-36, Apr 2012. ISSN 1532-2513 (Electronic)
0892-3973 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970621> >.

NEUGEBAUER, V. et al. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Mol Pain**, v. 3, p. 8, Mar 28 2007. ISSN 1744-8069 (Electronic)
1744-8069 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391515> >.

NEVES, L. M. S. et al. Photobiomodulation Therapy Improves Acute Inflammatory Response in Mice: the Role of Cannabinoid Receptors/ATP-Sensitive K(+) Channel/p38-MAPK Signalling Pathway. **Mol Neurobiol**, Oct 4 2017. ISSN 1559-1182 (Electronic)
0893-7648 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28980210>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-017-0792-z> >.

NIRMAL, P. et al. Influence of six medicinal herbs on collagenase-induced osteoarthritis in rats. **Am J Chin Med**, v. 41, n. 6, p. 1407-25, 2013. ISSN 0192-415X (Print)
0192-415X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228609>
<https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X13500948> >.

NIRMAL, P. S. et al. Cartilage protective effect of *Sida cordifolia* L. and *Piper longum* L. is through modulation of MMPs and TIMP. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 11, p. 480 - 488, 2015.

NIRMAL, P. S. et al. New herbal composition (OA-F2) protects cartilage degeneration in a rat model of collagenase induced osteoarthritis. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 6, Jan 3 2017. ISSN 1472-6882 (Electronic)
1472-6882 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28049462>
<https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12906-016-1535-9> >.

ORGANIZATION, W. H. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. **World Health Organ Tech Rep Ser**, p. i-x, 1-218, back cover, 2003. ISSN 0512-3054 (Print)
0512-3054 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679827> >. Acesso em: 10th April.

OSTALOWSKA, A. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 2, p. 139-45, Feb 2006. ISSN 1063-4584 (Print) 1063-4584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289733> >.

PALIWAL, M. N.; SONTAKKE, A. N.; PALIWAL, P. Study of serum malondialdehyde & reduced glutathione level in patients with osteoarthritis. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 2, n. 30, p. 5682-5687, 2013.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 6, p. 1237-47, Jun 2001. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11407681> >.

PIGATTO, G. R. et al. Light-Emitting Diode Phototherapy Reduces Nocifensive Behavior Induced by Thermal and Chemical Noxious Stimuli in Mice: Evidence for the Involvement of Capsaicin-Sensitive Central Afferent Fibers. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 5, p. 3205-3218, Jul 2017. ISSN 1559-1182 (Electronic) 0893-7648 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056078> <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-016-9887-1> >.

PITCHER, T.; SOUSA-VALENTE, J.; MALCANGIO, M. The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse. **J Vis Exp**, n. 111, May 16 2016. ISSN 1940-087X (Electronic) 1940-087X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27214709> <https://www.jove.com/pdf/53746/jove-protocol-53746-the-monoiodoacetate-model-of-osteoarthritis-pain-in-the-mouse> >.

REGAN, E. et al. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 11, p. 3479-91, Nov 2005. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255039> http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/art.21387/asset/21387_ftp.pdf?v=1&t=jdy_nchr5&s=007e3a573eebd5cc9dd23255dbc3555986cfe573 >.

REUMATOLOGIA, S. B. D. Osteoartrite (Artrose). 2017. Disponível em: < <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/osteoartrite-artrose/> >. Acesso em: 26th April.

SABRI, M. I.; OCHS, S. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mammalian nerve by iodoacetic acid. **J Neurochem**, v. 18, n. 8, p. 1509-14, Aug 1971. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4398402> >.

SAGAR, D. R. et al. The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. **Mol Pain**, v. 7, p. 88, Nov 17 2011. ISSN 1744-8069 (Electronic)

1744-8069 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093915> >.

SALEHPOUR, F. et al. Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review. **Mol Neurobiol**, Jan 11 2018. ISSN 1559-1182 (Electronic)

0893-7648 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29327206>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-017-0852-4> >.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**. Canoas - RS: Ed. Ulbra, 2004.

SCHMIDT, M. M.; DRINGEN, R. Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. **Front Neuroenergetics**, v. 1, p. 1, 2009. ISSN 1662-6427 (Electronic)

1662-6427 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584905>
https://fjfsdata01prod.blob.core.windows.net/articles/files/463/publishers-proof/pdf/.versions/1?sv=2015-12-11&sr=b&sig=0NtP%2FiB55vBOPMxExZD8pbi8aWL2iO7ytYHAvCTXrhM%3D&se=2018-05-15T19%3A09%3A46Z&sp=r&rscd=attachment%3B%20filename%2A%3DUTF-8%27%27001_2009.pdf >.

SCHUELERT, N.; MCDUGALL, J. J. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. **Neurosci Lett**, v. 465, n. 2, p. 184-8, Nov 13 2009. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716399> >.

SINUSAS, K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. **Am Fam Physician**, v. 85, n. 1, p. 49-56, Jan 1 2012. ISSN 1532-0650 (Electronic)

0002-838X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230308> >.

SUN, Y. et al. Beneficial effect of 20hydroxyecdysone exerted by modulating antioxidants and inflammatory cytokine levels in collageninduced arthritis: A model for rheumatoid arthritis. **Mol Med Rep**, v. 16, n. 5, p. 6162-6169, Nov 2017. ISSN 1791-3004 (Electronic)

1791-2997 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28901397> >.

SUTRADHAR, R. K. et al. Anti-inflammatory and analgesic alkaloid from *Sida cordifolia* linn. **Pak J Pharm Sci**, v. 20, n. 3, p. 185-8, Jul 2007. ISSN 1011-601X (Print)

1011-601X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545101> >.

TETIK, S. et al. Determination of oxidant stress in plasma of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis patients. **Indian J Biochem Biophys**, v. 47, n. 6, p. 353-8, Dec 2010. ISSN 0301-1208 (Print)
 0301-1208 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21355418> >.

TSAI, S. R.; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **J Photochem Photobiol B**, v. 170, p. 197-207, May 2017. ISSN 1873-2682 (Electronic)
 1011-1344 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28441605> >.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. 4. São Paulo - SP, Brazil: 2014.

WALT, W. A. L. T. Dose Table 780-860nm for Low Level Laser Therapy WALT 2010., 2010a. Disponível em: < https://waltza.co.za/wp-content/uploads/2012/08/Dose_table_780-860nm_for_Low_Level_Laser_Therapy_WALT-2010.pdf >. Acesso em: 07/05/2018.

_____. Dose table 904nm for Low Level Laser Therapy WALT 2010. 2010b. Disponível em: < https://waltza.co.za/wp-content/uploads/2012/08/Dose_table_904nm_for_Low_Level_Laser_Therapy_WALT-2010.pdf >. Acesso em: 07/05/2018.

WANG, P. et al. Effects of low-level laser therapy on joint pain, synovitis, anabolic, and catabolic factors in a progressive osteoarthritis rabbit model. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 6, p. 1875-85, Nov 2014. ISSN 1435-604X (Electronic)
 0268-8921 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890034>
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-014-1600-x> >.

XIA, B. et al. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. **Calcif Tissue Int**, v. 95, n. 6, p. 495-505, Dec 2014. ISSN 1432-0827 (Electronic)
 0171-967X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311420> >.

YUI, N. et al. Mechanical and Oxidative Stress in Osteoarthritis. **J Phys Fitness Sports Med**, v. 5, n. 1, p. 81-86, 2016.

ZHANG, R. X.; REN, K.; DUBNER, R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 21, n. 9, p. 1308-15, Sep 2013. ISSN 1522-9653 (Electronic)
 1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23973145> >.

ZHANG, W. et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 4, p. 476-99, Apr 2010. ISSN 1522-9653 (Electronic) 1063-4584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170770> >.

ZHANG, Y.; JORDAN, J. M. Epidemiology of osteoarthritis. **Clin Geriatr Med**, v. 26, n. 3, p. 355-69, Aug 2010. ISSN 1879-8853 (Electronic) 0749-0690 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699159> >.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 004/2016

Título: **Laser de baixa potência e Sida Tuberculata na
Osteoartrite de joelho**

Data da aprovação: 20.04.2016

Período de vigência do projeto: 30.06.2019

Pesquisador: Eloá Ferreira Yamada

Campus: **Uruguiana**

Telefone: 55 81023429

E-mail: eloayamada@unipampa.edu.br

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Vanusa Manfredini', is written over a light grey rectangular background.

Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA