



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Avaliação da recuperação da cartilagem articular do
tornozelo de ratos após aplicação de um protocolo de
alongamento cíclico da musculatura posterior da perna após
imobilização**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Fisioterapia da Universidade federal de
São Carlos como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Fisioterapia – Área de Concentração em
Processos de Avaliação e Intervenção

Aluna: Carolina Náglio Kalil Dias
Orientadora: Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello Goncalves-Rosa

São Carlos / SP
Fev / 2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D541ec

Dias, Carolina Náglio Kalil.

Avaliação da recuperação da cartilagem articular do tornozelo de ratos após aplicação de um protocolo de alongamento cíclico da musculatura posterior da perna após imobilização / Carolina Náglio Kalil Dias. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

39 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Cartilagem articular. 2. Imobilização. 3. Exercícios de alongamento. 4. Recuperação de função fisiológica. I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado de CAROLINA NÁGLIO KALIL DIAS, DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE FEVEREIRO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



STELA MÁRCIA MATTIELLO GONÇALVES ROSA
(UFSCar)



NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO
(UFSCar)



WALCY ROSOLIA TEODORO
(USP)

DEDICATÓRIA:

A DEUS, por me dar saúde e força, me proteger e guiar durante esses dois anos de busca pelos meus objetivos.

AOS MEUS PAIS, ELIZABETH NÁGLIO KALIL DIAS e OSWALDO KALIL DOS SANTOS DIAS, por todo o esforço feito todos esses anos para me dar uma boa educação, já que muitas vezes deixaram seus sonhos de lado para realizar os meus, pelo exemplo de caráter, pelo incentivo, compreensão, amor e companheirismo durante essa fase que se encerra.

A MINHA AVÓ DILMA HELENA NÁLIO DIAS, a minha “vó cheirosa” sempre presente em minha vida, sem a qual também não conseguiria chegar até aqui, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e sempre bons conselhos. Meu amor por você é incondicional, e sei que onde quer que hoje você esteja, esta muito orgulhosa de mim. Muitas saudades!!!!

AO MEU IRMÃO, THIAGO NAGLIO KALIL DOS SANTOS DIAS, por sempre estar ao meu lado, pelo companheirismo e amor sempre.

AO MEU NAMORADO, RAFAEL XAVIER ITO, pelo amor, companheirismo, pela paciência e compreensão, pelos conselhos, ajudas e “puxadas de orelha”, os quais sempre foram essenciais, e por estar ao meu lado sempre acreditando em mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

A Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello Gonçalves-Rosa

Pela oportunidade de fazer parte de um Programa de Pós Graduação de excelente qualidade; por me acolher em seu laboratório, confiar em mim, e acreditar que eu seria capaz de me desenvolver em sua linha de pesquisa, que era totalmente nova para mim. Por me orientar neste projeto de pesquisa e para a vida, por me passar seus conhecimentos não só sobre a cartilagem articular, mas também sobre a Ortopedia. Obrigada por me ajudar a amadurecer como pesquisadora, na leitura, busca de artigos, no conhecimento de novas metodologias, e na escrita de projetos e artigos, e também como pessoa.

Minha admiração por você é enorme, e minha gratidão também!

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus tios Flávia Nálío Dias e Roberto Andrade Dias Júnior, pelo apoio inicial e de sempre, por estarem sempre ao meu lado, pela amizade e carinho.

Às minhas amigas Carol Souza, Lívia Ribeiro, Davilene, Karina Cancellieiro, Jacqueline Bernini, Rodrigo, Viviane, Patrícia, pela amizade e apoio de sempre.

Às amigas e colegas do LAFar Renata Nogueiron, Karina Gramani, Paula Regina, Giovanna Lessi, pelas risadas compartilhadas no laboratório.

Ao meu amigo Michel, pela amizade carinho, e ajuda nas estatísticas deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Thiago Russo, Sabrina Peviani, João Durigan, Cris Prado, Gabriel Delfino, Paula Camargo, Marê, Tereza, pela ajuda, pelas risadas e companheirismo sempre.

À Adriana, pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelo companheirismo, pelo ombro amigo e principalmente pela paciência nas horas de desespero.

À técnica em psicologia da Unidade Saúde Escola (USE) da UFSCar Alessandra, por todo o apoio fundamental dado nesses dois anos.

Aos alunos Anderson (Wando) e Fernando (Zé) pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Tânia de Fátima Salvini, por me abrir as portas de seu laboratório e pelo incentivo a participar de outras pesquisas.

Ao Prof. Nivaldo Parizotto, por também abrir as portas de seu laboratório.

À amiga Natália pela amizade, pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento de parte dos experimentos.

Aos Professores Jorge Oishi e Carlos Diniz, do Departamento de Estatística da UFSCar, pelos ensinamentos e ajuda na interpretação dos dados deste trabalho.

À funcionária técnica bióloga Ana Maria Rocha do Departamento de Patologia da FMRP/USP pela ajuda e ensinamentos passados, de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Ana Claudia Sverzuti do Departamento de Patologia da FMRP/USP, por abrir as portas de seu laboratório e a sua técnica, Maria Paula pelos ensinamentos passados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iii
Agradecimento Especial.....	iv
Agradecimentos.....	v
Índice de Figuras – Contextualização do tema.....	vii
Índice de Figuras – Artigo.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Contextualização do Tema.....	1
1.1. Estrutura e Organização da Cartilagem Articular.....	1
1.2. Alterações da cartilagem articular resultantes da aplicação de carga.....	6
1.3. A imobilização e a Cartilagem Articular.....	8
1.4. O Alongamento e a Cartilagem Articular.....	10
1.5. Recuperação da Cartilagem Articular.....	11
2. Objetivo.....	13
3. Bibliografia.....	14
4. Artigo.....	17
5. Resumo.....	19
6. Abstract.....	20
7. Introdução.....	21
8. Material e Métodos.....	23
9. Análise Estatística.....	28
10. Resultados.....	29
11. Discussão.....	33
12. Conclusão.....	37
13. Referências Bibliográficas.....	38

ÍNDICE DE FUGURAS – CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

- Figura 1**– Esquema ilustrado do ambiente físico do condrócito na cartilagem articular, com os principais componentes da MEC. **FONTE:** MOBASHERI, A.; CARTER, S. D.; MARTIN-VASALLO, P. et al. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. **Cell Biol Int.** 26, 1-18, 2002.....2
- Figura 2** - Esquema dos processos de síntese e degradação da matriz extracelular. À esquerda, atuação dos inibidores de proteinases e fatores de crescimento estimulando a síntese de proteoglicanas e colágeno. À direita, atuação do fator de necrose tumoral alfa e interleucinas 1 e 6, estimulando o condrócito a produzir metaloproteinases, degradando colágeno e proteoglicanas.....4
- Figura 3** - Esquema ilustrado da organização de condrócitos em camadas na cartilagem articular.**FONTE:** LYONS, T. J.; SHEENA, F. McC; ROBERT, W. S. et al. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. **BMC Musculoskeletal Disorders.** 7 (52), 2006.....6
- Figura 4** - Esquema ilustrado da organização das fibras colágenas em camadas na cartilagem articular. **FONTE:** VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concept and future directions. **Osteoarthritis Cartilage.** 10, 408-419, 2002.....6

ÍNDICE DE FIGURAS – ARTIGO

<u>Figura 1</u> – Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento. (A) Celularidade normal - grupo C; (B) Hiperclulridade - grupo AR, pata não tratada (Barra = 100 μ m).....	26
<u>Figura 2</u> – Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, com pares de clones (Barra = 100 μ m).....	26
<u>Figura 3</u> - Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, mostrando o método de análise das médias das espessuras total da cartilagem. Os * mostram as invaginações do osso subcondral em direção à cartilagem calcificada.....	27
<u>Figura 4</u> -. Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, mostrando o método de análise da espessura (A) da cartilagem calcificada e (B) da cartilagem não calcificada.....	27
<u>Figura 5</u> - Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, mostrando o método de análise morfométrica para contagem manual de células (Barra = 100 μ m).....	28
<u>Figura 6-</u> Média do escore de graduação de presença de clones dos diferentes grupos.....	31
<u>Figura 7</u> - Média do escore de graduação da celularidade dos diferentes grupos.	31
<u>Figura 8</u> — Médias do número de células presentes na cartilagem dos diferentes grupos.....	32
<u>Figura 9</u> - Média das espessuras da cartilagem total, da cartilagem calcificada e da cartilagem não calcificada dos diferentes grupos.....	32

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u> - Sistema de graduação para avaliação dos níveis de lesão da cartilagem articular a partir de Sistemas de Graduação Histológico-Histoquímico de Mankin et al (1971) modificados.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

MEC	Matriz extracelular
GAGs	Glicosaminoglicanas
AH	Ácido hialurônico
BMPs	Proteína morfogênica óssea
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
IL-1β	Interleucina-1β
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
MMPs	Metaloproteinases
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases

CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

Estrutura e organização da cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado, avascular e aneural, composto exclusivamente por células chamadas condrócitos e uma grande quantidade de matriz extracelular (MEC) altamente especializada. Enquanto a MEC é o componente funcional da cartilagem articular, os condrócitos são responsáveis pela homeostase deste tecido (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). A MEC é composta por uma densa rede de fibras colágenas, proteoglicanas e agregados de proteoglicanas, e principalmente por água. Também é composta por sais inorgânicos e pequena quantidade de outras proteínas da matriz, glicoproteínas e lipídeos (VANWANSELE, LUCCHINETTI; STUSSI, 2002; SANDELL; HERING, 2001; ECKSTEIN, HUDELMAIER; PUTZ, 2006). A qualidade estrutural das fibras colágenas e proteoglicanas determina a função mecânica da cartilagem (TRUDEL, UHTHOFF; LANEUVILLE, 2005). Componentes importantes das proteoglicanas são as glicosaminoglicanas (GAG), que podem ser sulfatadas (sulfato 4 de condroitina, sulfato 6 de condroitina e queratan sulfato), e não-sulfatadas (ácido hialurônico - AH), que possuem alta capacidade de reter água (BALAZS; LAURENT; JEANLOZ, 1986) (fig. 1). Por sua característica hidrofílica, as GAGs tem um papel importante na lubrificação e nutrição da cartilagem articular (NAKAYAMA et al, 2000).

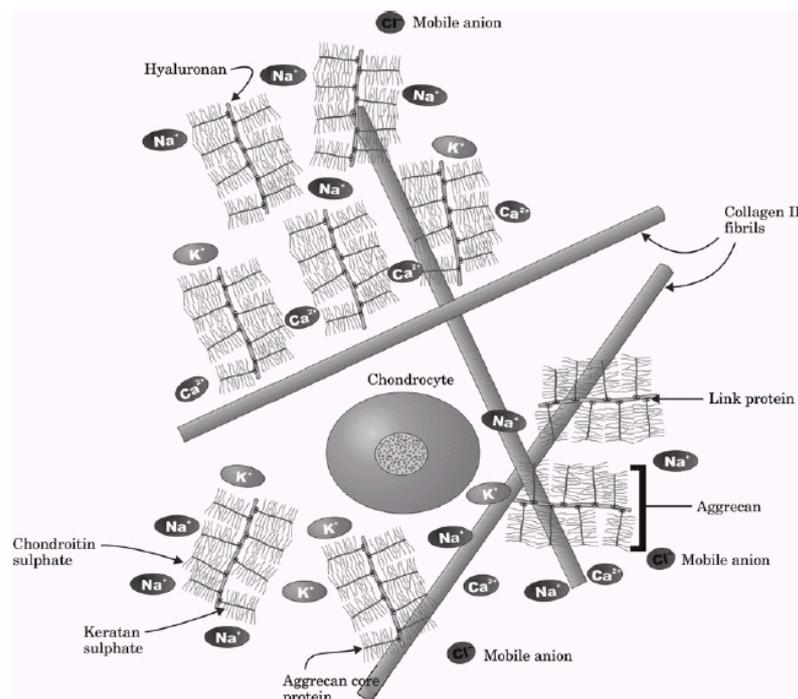


Fig. 1 – Esquema ilustrado do ambiente físico do condrocito na cartilagem articular, com os principais componentes da MEC. **FONTE:** MOBASHERI, A.; CARTER, S. D.; MARTIN-VASALLO, P. et al. *Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. Cell Biol Int.* 26, 1-18, 2002.

Dos componentes da MEC o colágeno representa 60% das macromoléculas presentes. Os tipos de colágeno da matriz variam, sendo encontrado o II como principal proteína fibrosa da cartilagem hialina (95%), o XI (3%), e o IX (1%) (WHITING; ZERNICKE, 2001). A orientação das fibras colágenas na cartilagem articular é um importante determinante da integridade e função do tecido (BI et al, 2005). As fibras colágenas e as proteoglicanas são os componentes estruturais da cartilagem articular que, juntos, suportam o stress mecânico interno resultante da aplicação de carga na superfície articular (VANWANSEELE, LUCCHINETTI ; STUSSI, 2002).

A saúde da cartilagem articular depende dos condrocitos, componente singular da cartilagem articular hialina, considerado como células diferenciadas que fazem a manutenção da MEC da cartilagem articular sobre condições normais. Estes encontram-se espalhados em lacunas na MEC (GOLDRING, 2000; ARCHER; FRANCIS-WEST, 2003). Sabe-se que os condrocitos sintetizam componentes da MEC como proteoglicanas,

colágeno, fibronectina, integrinas e outras proteínas adesivas que são necessárias para a manutenção de altas forças tensivas e baixa compressibilidade sob carga (ISHIGURO, KOJIMA; POOLE, 2002), e mantém um balanço entre anabolismo e catabolismo da MEC (AIGNER, et al. 2001). Através do fluxo transsinovial que ocorre entre os capilares e vasos linfáticos da sinóvia e os condrócitos, ocorre uma troca de nutrientes e catabólitos (GARNERO; ROUSSEAU; DELMAS, 2000).

A cartilagem articular é um tecido de lento *turnover* e remodelamento, onde, em condições normais, há um balanço entre anabolismo e catabolismo, para a homeostase do tecido (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). O anabolismo é de vital importância para cartilagem manter sua integridade, já que está constantemente sujeita à stress mecânico e proteólise catabólica. As proteínas morfogênicas do osso (BMPs), pertencentes a superfamília do fator de crescimento transformador beta- β (TGF- β), são consideradas os mais potentes fatores anabólicos da cartilagem articular, aumentando a síntese de proteoglicanas e colágeno tipo II (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). A degradação da cartilagem frente à estímulos lesivos ocorre através da síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos condrócitos, incluindo a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que estimulam a produção de uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs) (YASUDA, 2006). A cascata proteolítica que ocorre na osteoartrite, degradando colágenos e agregano, envolve colagenases, como a MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase neutrofílica) e MMP-13 (colagenase-3), gelatinases (MMP-9 e MMP-2), e estromelisinases, em particular MMP-3 (estromelisinase-3). Para haver homeostase tecidual, inibindo os efeitos anabólicos das MMPs, os condrócitos produzem inibidores de metaloproteinases, denominados TIMPs (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006) (fig. 2).

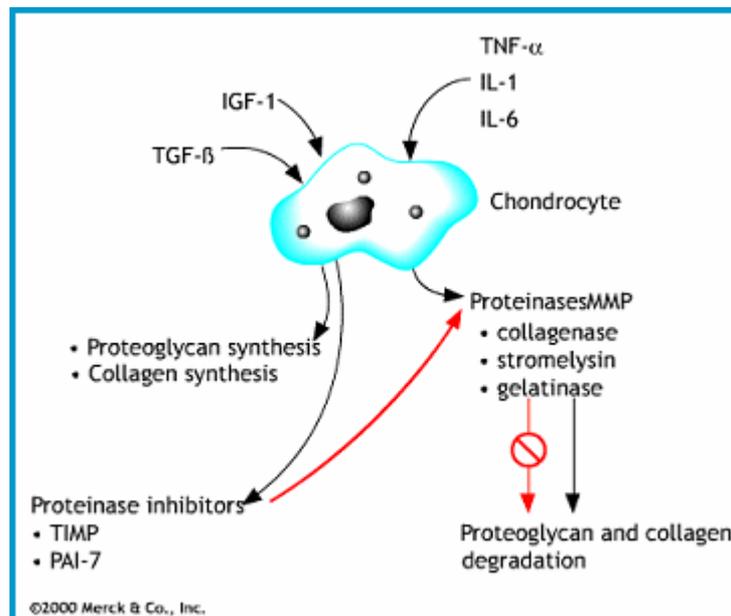


Fig. 2 – Esquema dos processos de síntese e degradação da matriz extracelular. À esquerda, atuação dos inibidores de proteínases e fatores de crescimento estimulando a síntese de proteoglicanas e colágeno. À direita, atuação do fator de necrose tumoral alfa e interleucinas 1 e 6, estimulando o condrócito a produzir metaloproteínases, degradando colágeno e proteoglicanas.

As mudanças na morfologia da cartilagem articular são influenciadas pelas adaptações deste tecido às demandas funcionais de absorção e redistribuição de forças compressivas. Assim, a estrutura da cartilagem articular muda conforme se aprofunda a partir da superfície até a região subcondral, dando a cada região, diferentes características biomecânicas. Apesar dessas mudanças serem contínuas conforme a profundidade, a cartilagem articular pode ser dividida em 4 zonas ou regiões (fig. 3 e 4):

- **Superficial:** Mais fina, possui condrócitos achatados, maior quantidade de colágeno e menor quantidade de proteoglicanas. As fibras colágenas são orientadas firmemente em paralelo a superfície articular para maior resistência às forças de cisalhamento.
- **Média:** Maior que a superficial, é a zona de transição entre as regiões superficial e profunda. Os condrócitos são arredondados, e juntamente com as fibras colágenas, não se dispõem mais em paralelo à superfície, mas em um modelo de transição da horizontal para

a vertical, de forma dispersa, para melhor resistências às forças compressivas. Possui maior quantidade de proteoglicanas com menor conteúdo de água.

Profunda: Essa região também é maior em relação à superficial, as fibras colágenas emergem da zona calcificada de onde são ancoradas e se dispõem verticalmente. Os condrócitos são arredondados, se dispõem em colunas, e possuem uma atividade metabólica mais elevada. Possui maior concentração de proteoglicanas e menor concentração de água. A transição entre a matriz da cartilagem não calcificada e a cartilagem calcificada ocorre através da Tidemark.

A Tidemark é uma linha com mais de 10 μ m de espessura, que divide claramente a cartilagem não calcificada da cartilagem calcificada. É uma estrutura complexa em 3D que acompanha os prolongamentos da região profunda da cartilagem não calcificada, se estende pela camada calcificada até o osso subjacente e medula óssea, e está envolvida na nutrição, mineralização e transmissão de forças da cartilagem hialina ao osso (LYONS, et al, 2006).

- **Calcificada:** Região de transição entre a cartilagem articular e o osso subcondral. A matriz é maciçamente impregnada por sais de cálcio, e a quantidade de condrócitos é menor (ANGEL et al,2003; VANWANSEELE, LUCCHINETTI; STUSSI, 2002).

Cabe ressaltar, que a estrutura da cartilagem muda de uma articulação para outra. Comparando-se as cartilagens do tornozelo e do joelho, observa-se que o tornozelo possui uma cartilagem mais fina e de superfície mais uniforme. As células da camada superficial são organizadas em lacunas de 2 a 4 células. No joelho, a cartilagem é mais espessa, com espessura mais irregular e os condrócitos da camada superficial são organizados em lacunas com apenas 1 célula. O tornozelo possui maior conteúdo de GAGs sulfatadas, menor conteúdo de água, maior rigidez dinâmica e menor permeabilidade hidráulica que o joelho. Essas características tornam a cartilagem do tornozelo mais resistente aos efeitos deletérios das altas forças compressivas (KUETTNER; COLE, 2005).

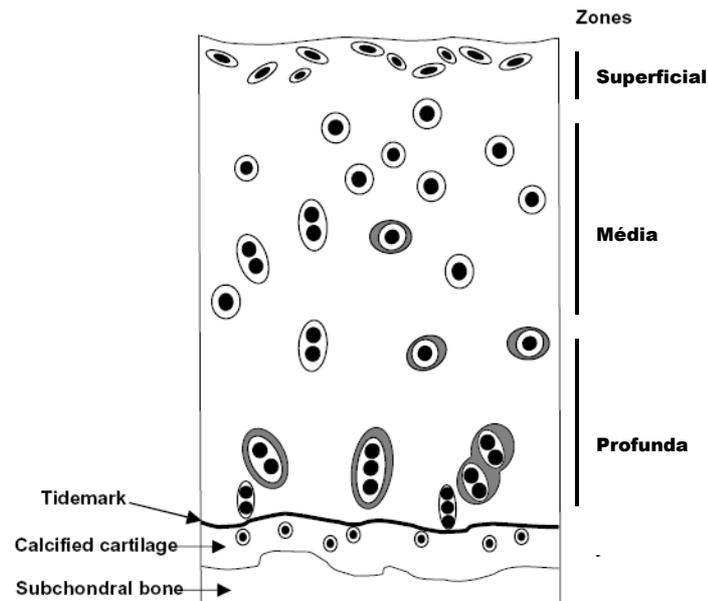


Fig. 3 - Esquema ilustrado da organização de condrócitos em camadas na cartilagem articular. **FONTE:** LYONS, T. J.; SHEENA, F. McC; ROBERT, W. S. et al. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 7 (52), 2006.

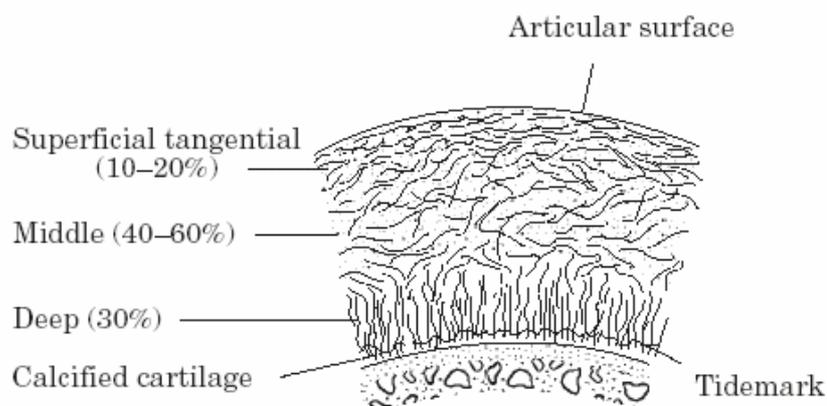


Fig. 4 – Esquema ilustrado da organização das fibras colágenas em camadas na cartilagem articular. **FONTE:** VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concept and future directions. *Osteoarthritis Cartilage*. 10, 408-419, 2002.

Alterações da cartilagem articular resultantes da aplicação de carga

A cartilagem articular tem a função de promover uma superfície de suporte de carga com baixo atrito, que permite aos ossos das articulações diartrodiais deslizarem

suavemente um em relação ao outro, enquanto transmitem carga (NUGENT-DERFUS et al, 2007).

É considerada um material visco-elástico com 2 fases distintas: Fase sólida (MEC orgânica sólida ou rede de colágenos), responsável pela força tênsil da matriz, e fase fluida móvel (proteoglicanas, água intersticial com sais inorgânicos dissolvidos), responsável pelo inchaço osmótico do tecido. Essas duas fases permitem a absorção e distribuição de carga pela superfície macia e lubrificada, facilitando o movimento. O comportamento visco-elástico do tecido deve-se primeiramente pelo fluxo do fluido intersticial e pela visco-elasticidade intrínseca da matriz (VANWANSEELE, LUCCINETTI; STÜSSI, 2002; AGNER, SOEDER; HAAG, 2006). Na falta de carga, o fluido deste tecido se espalha por todo o espaço, e na presença de carga, a cartilagem é comprimida. A permeabilidade da cartilagem permite que haja quantidade certa de fluido para resistir à absorção de choque promovido pela carga mecânica. Com o tempo a carga cíclica enfraquece a superfície da cartilagem, reduzindo sua permeabilidade e impedindo o fluxo de fluidos. A disposição das fibras colágenas em cada região da cartilagem, associados às propriedades e concentrações de proteoglicanas, tem implicações biomecânicas sobre a cartilagem. O dano na rede de colágeno e a perda de proteoglicanas leva a processo degenerativo da cartilagem articular, denominada osteoartrite. Após a perda de proteoglicanas, a cartilagem fica menos elástica mais susceptível à dano das moléculas de colágeno, que leva a progressiva deterioração da integridade da cartilagem articular (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). Assim a cartilagem passa a contar somente com a força mecânica das macromoléculas como única proteção à aplicação de carga (WHITING; ZERNICKE, 2001).

As forças mecânicas e motilidade têm grande influência na estrutura, organização, síntese e degradação da cartilagem articular (CARTER et al, 2004). Aplicação de carga em magnitudes fisiológicas gera alteração no aspecto e volume do condrócito em toda a

profundidade da cartilagem, mudando seu estado metabólico e influenciando a atividade sintética desse tecido, para manutenção e adaptação do mesmo (CLARK et al, 2003; MOBASHERI et al, 2002). Forças compressivas e de cisalhamento aplicadas na superfície de cartilagens levam a um aumento na síntese de colágeno e proteoglicanas (DAVISSON et al, 2002).

Estudos indicam que a resposta da cartilagem articular à carga depende basicamente da duração e magnitude dessa compressão (IKEMOUE, et al, 2003). A falta de carga na cartilagem articular gera uma redução acentuada na síntese e na quantidade de proteoglicanas na cartilagem e aumento no conteúdo de água, aumentando assim sua maciês, e contribuindo para a evolução do processo degenerativo (HAAPALA et al, 1999). Como as proteoglicanas são os maiores componentes da cartilagem articular, sua perda pode resultar em destruição da cartilagem (POOLE, 2000). Há também uma redução no tamanho e na quantidade de agregados de proteoglicanas e uma maior fibrilação da superfície da cartilagem (MANKIN et al, 1994). Uma vez que a integridade da zona superficial é perdida, a cartilagem abaixo fica mais exposta a estresse, causando alterações que se estenderiam da superfície até camadas mais profundas (HAAPALA et al, 1999).

A imobilização e a cartilagem articular

A ausência de carga também prejudica a cartilagem. A imobilização da articulação diminui a espessura da cartilagem, principalmente nas regiões não calcificadas (VANWANSEELE, 2003) e reduz a rigidez da cartilagem (KIVIRANTA et al, 1994). Alguns autores classificam as alterações que ocorrem na cartilagem articular decorrentes da imobilização como degenerativas (VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STÜSSI, 2002). Haapala et al (1999) demonstraram que a imobilização causa mudanças atroficas na cartilagem articular resultando em quiescência de síntese neste tecido. Os autores afirmam

que depleção de GAGs sem dano na rede de fibras colágenas, não é suficiente para iniciar a deterioração da cartilagem.

Segundo Renner et al, (2006), a imobilização gera diminuição na quantidade de proteoglicanas determinada pela perda da coloração por Safranina-O, observada em maior quantidade na zona superficial da cartilagem articular. Gera alteração na quantidade de condrócitos na mesma lacuna. Além disso, ao comparar a pata imobilizada e a contralateral, pode encontrar-se um aumento na população de condrócitos na pata contralateral, que possivelmente ocorre pela sobrecarga gerada no membro contralateral decorrente da imobilização.

As alterações na cartilagem articular decorrentes da imobilização variam com o tipo de dispositivos, posicionamento articular e períodos de imobilização utilizados. Em um exame pouco detalhado observa-se uma superfície lisa, contínua e sem sinais de fibrilação. Segundo Leroux et al (2001), não há alteração na espessura total da cartilagem, na espessura da cartilagem calcificada, e da não calcificada após imobilização durante 4 semanas. Com relação ao conteúdo de água, Setton et al (1997) encontrou que após 8 semanas de imobilização não rígida houve uma hidratação da cartilagem articular. Porém, Leroux et al (2001) não observou alterações no conteúdo de água na cartilagem articular após 4 semanas de imobilização rígida. Leroux et al (2001), não observou alterações no conteúdo de proteoglicanas da cartilagem articular após 4 semanas de imobilização.

O Alongamento e a cartilagem articular

A recuperação do movimento articular é uma terapêutica usada em protocolos de reabilitação depois da imobilização. Os procedimentos terapêuticos utilizados para recuperação do movimento podem variar, como por exemplo, remobilização, exercício físico e alongamentos. Porém, as alterações bioquímicas e metabólicas na cartilagem

articular decorrentes das terapêuticas utilizadas ainda não são conclusivas (LEROUX et al, 2001; NARMONEVA et al, 2002).

Alguns estudos avaliaram os efeitos do exercício e da livre deambulação na cartilagem articular, como forma de remobilização, e encontraram melhores resultados da aplicação de exercício em comparação à livre deambulação sobre articulações saudáveis e estáveis (NEWTON et al, 1997).

O estímulo mecânico compressivo causa aumento na atividade metabólica dos condrócitos e no o conteúdo de proteoglicanas na matriz, além de causar, a longo prazo, rigidez na cartilagem. A lesão da cartilagem depende da intensidade da carga, ou seja, quanto maior a carga, maior o dano, e que quanto maior a taxa de movimento envolvida na atividade, maior a deformação da cartilagem. Porém, a falta de exercício gera maior deformação. As características estruturais da cartilagem articular se diferem de acordo com o passar do tempo, ou seja, com o envelhecimento do indivíduo, e também da forma como a cartilagem articular de cada indivíduo responde a estímulos mecânicos. Desta forma, não há diferença na característica deste tecido entre indivíduos que praticam e indivíduos que não praticam exercício (ECKSTEIN et al, 2005; VANWANSEELE, LUCCHINETTI; STÜSSI, 2002).

Weaver e Haut (2005) mostraram que quando é impactada uma carga na cartilagem retro-patelar através de um aparelho, e é mantida a livre deambulação para recuperação por 24 meses, há significativa calcificação/ossificação, erosão e extensiva perda de integridade da superfície da cartilagem, o que pode deixar essa articulação rígida, com uma desorganização dos condrócitos e perda de proteoglicanas. Quando é aplicado o exercício em esteira após a lesão nessa articulação, as suas as características histológicas citadas acima mostram-se menos acentuadas. Porém, existem poucos estudos na literatura que abordam estas características da cartilagem, principalmente em seu aspeto histológico.

Poucos estudos aparecem na literatura quanto à resposta da cartilagem ao alongamento muscular, uma vez que esta prática é utilizada para ganho de flexibilidade muscular em diferentes situações. Aroski et al, (2000) afirmaram que o alongamento muscular é prejudicial para a cartilagem previamente imobilizada, pelo fato da compressão contínua diminuir a síntese de proteoglicanas e causar lesão do tecido levando a necrose. No estudo de Renner et al, (2006), os animais que foram alongados 7 vezes por semana, durante 3 semanas não apresentaram diferenças em relação às adaptações dos condrócitos e proteoglicanas, frente ao alongamento muscular, comparado ao grupo controle, indicando ausência de dano ou reposta tecidual. Esses mesmos resultados indicaram que o mesmo protocolo de alongamento não prejudicou a cartilagem sadia. Porém, os animais que tiveram suas patas imobilizadas e posteriormente alongadas apresentaram alterações na quantidade de condrócitos, que se mostrou elevada, assim como perda de proteoglicanas. Este estudo mostrou um déficit metabólico e estrutural presente na cartilagem, quando o protocolo de alongamento muscular após imobilização foi utilizado. Entretanto, após o período de tratamento pela remobilização, exercício físico ou alongamento é desconhecida a recuperação da cartilagem articular.

Recuperação da cartilagem articular

O período de recuperação da cartilagem articular após a aplicação das intervenções terapêuticas, como a imobilização, remobilização, exercício físico ou alongamento é desconhecida. Segundo Haapala et al (1999), período de remobilização, não existe diferença significativa na espessura da cartilagem. Kiviranta et al (1994) demonstraram que não houve nenhuma recuperação da espessura nas diferentes áreas do tecido cartilaginoso, principalmente naquelas submetidas a menos compressão. A concentração de

proteoglicanas foi reduzida em todas as amostras imediatamente depois da imobilização quando comparadas com um grupo controle, mesmo após 50 semanas de remobilização.

Haapala et al (1999) estudaram a recuperação (50 semanas em livre deambulação nas gaiolas), da atrofia da cartilagem articular induzida pela imobilização durante 11 semanas, e observaram que após o período de imobilização a concentração de GAG da cartilagem articular não-calcificada foi reduzida em 20-23%, e a redução foi maior na zona superficial (44%). Depois de 50 semanas de recuperação, a concentração de GAG foi restaurada na maioria das áreas analisadas, exceto nas partes superiores da cartilagem não-calcificada (9-17% menos GAG que o grupo controle). Isto sugere que a imobilização prolongada da articulação pode causar alterações de proteoglicanas da cartilagem articular ao mesmo tempo em que a organização do colágeno se torna altamente imutável. Visto que a proteoglicana exerce grande influência nas propriedades biomecânicas da cartilagem, a imobilização prolongada pode por em risco o bem estar da cartilagem articular. Renner et al, (2006) observou que a imobilização seguida de recuperação por 3 semanas provocou diminuição no conteúdo de proteoglicanas e condrócitos na cartilagem. No estudo de Juvelin et al (1986), a imobilização durante 11 semanas diminuiu a espessura da cartilagem em 9%, e após 50 semanas de remobilização a espessura voltou aos níveis controle.

Objetivo

Avaliar morfológica e morfométricamente a cartilagem da articulação talocrural de ratos, no período de recuperação, quando submetidos à um protocolo de alongamento muscular cíclico pós-imobilização.

BIBLIOGRAFIA

AIGNER, T.; ZIEN, A.; GEHSITZ, A. et al. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. **Arthritis Rheum.** 44, 2777–2789, 2001.

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL-1 β and BMPs – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cell Mater.** 12, 49-56, 2006.

ANGEL, J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage repairs and response injury. **Spo Me Arthrosc Rev.** 11, 3, 168-18, 2003.

ARCHER, C.W.; FRANCIS-WEST, P. The chondrocytes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 35, 401–404, 2003.

AROKOSKI, J. P.A.; JURVELIN, J. S.; VÄÄTÄINEN, U. et al. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scand J Med Sci Sports.** 10, 186-98, 2000.

BALAZS, E. A.; LAURENT, T. C.; JEANLOZ, R. W. Nomenclature of hyaluronic acid. **Biochem J** letters; 235 (3), 903, 1986.

BI, X.; LI, G.; DOTY, S. B. et al. A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS). **Osteoarthritis Cartilage.** 13, 1050-1058, 2005.

CARTER, D. R.; BEAUPRÉ, G. S.; WONG, M. et al. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. **Clin Orthop.** 427s, s69-77, 2004.

CLARK, A. L.; BARCLAY, L. D.; MATYAS, J. R.; HERZOG, W. In situ chondrocyte deformation with physiological compression of the feline patelofemoral joint. **J Biomech.** 36, 553-568, 2003.

DAVISSON, T.; KUNIG, S.; CHEN, A. et al. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. **J. Orthop. Res.** 20, 842–848, 2002.

ECKSTEIN, F.; LEMBERGER, B.; GRATZKE, C. et al. In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. **Ann Rheum Dis.** 64, 291–295, 2005.

ECKSTEIN, F.; HUDELMAIER, M.; PUTZ, R. The effects of exercise on human articular cartilage. **J Anat.** 208, 491-512, 2006.

GARNERO, P.; ROUSSEAU, J. C.; DELMAS, P. D. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone cartilage and synovium in joint diseases. **Arthritis Rheum.** 43(5), 953-968, 2000.

GOLDRING, M. B. The role of chondrocytes in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.** 43(9), 1916-1926, 2000.

HAAPALA, J.; AROKOSKI, J. P. A.; HYTTINEN, M. M. et al. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. **Clin Orthop.** 1, 218-29, 1999.

IKEMOUE, T.; TRINDADE, M. C. D.; LEE, M. S. et al. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. **J Orthop Research.** 21, 110-16, 2003.

ISHIGURO, N.; KOJIMA, T.; POOLE, R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. **J Med Sci,** 65, 73-84, 2002.

JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I.; TAMMI, M. et al. Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. **Clin Orthop.** 207, 246-252, 1986.

KUETTNER, K. E.; COLE, A. A. Cartilage degeneration in different human joints. **Osteoarthritis Cartilage.** 13, 93-103, 2005.

KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J. et al. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the young canine knee joint after remobilization of the immobilized limb. **J Orthop Res.** 12, 161-7, 1994.

LEROUX, M. A.; CHEUNG, H. S.; BAU, J. L. et al. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis Cartilage.** 9, 633-40, 2001.

LYONS, T. J.; SHEENA, F. McC; ROBERT, W. S. et al. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. **BMC Musculoskeletal Disorders.** 7 (52), 2006.

MANKIN, H. J.; MOW, V. C.; BUCKWALTER, J. A. et al. Form and function of articular cartilage. In: SIMOM, S.R. (Ed.). **Orthopaedic Basic Scienc** (1-44). Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.

MOBASHERI, A.; CARTER, S. D.; MARTIN-VASALLO, P. et al. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. **Cell Biol Int.** 26, 1-18, 2002.

NAKAYAMA, Y.; SHIRAI, Y.; YOSHIHARA, K. et al. Evaluation of glycosaminoglycans levels in normal joint fluid of the knee. **J Nippon Med Sch.** 67(20), 92-95, 2000.

NUGENT-DERFUS, G. E.; TAKARA, B. S.; O'NEILL, J. K. Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4. **Osteoarthritis Cartilage.** 15, 566-574, 2007.

NARMONEVA, D. A.; CHEUNG, H.; WANG, J. Y. et al. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in canine model. **J Orthop Res.** 20, 83-91, 2002.

NEWTON, P. M.; MOW, V.C.; GARDNER, T.R. et al. The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. **Am J Spo Med.** 25, 282–287, 1997.

POOLE, AR. Cartilage in health and disease. In: *Arthritis and Allied Conditions: A textbook of rheumatology*. 14th edition. Edited by Koopman, WJ, Willians & Wilkins, Baltimore (2000).

RENNER, A. F.; CARVALHO, E.; SOARES, E.; MATTIELLO-ROSA, S. M. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. **OsteoArthritis and Cartilage.** 14, 196-202, 2006.

SANDELL, L.; HERING, T. Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis, 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001.

SETTON, L. A.; MOW, V. C.; MULLER, F. J. et al. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. **Osteoarthritis Cartilage.** 5, 1-16, 1997.

TRUDEL, G.; UHTHOFF, H.; LANEUVILLE, O. Knee joint immobility induces Mcl-1 gene expression in articular chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 333, 247–252, 2005.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concept and future directions. **Osteoarthritis Cartilage.** 10, 408-419, 2002.

VANWANSEELE, B.; ECKSTEIN, F.; KNECHT, H. et al. Longitudinal analysis of cartilage atrophy in the knees of patients with spinal cord injury. **Arthritis Rheum.** 48, 3377–3381, 2003.

WEAVER, B. T.; HAUT, R. C. Enforced exercise after blunt trauma significantly affects biomechanical and histological changes in rabbit retro-patellar cartilage. **Journal of Biomechanics.** 38, 1177–1183, 2005

WHITING, W. C; ZERNICKE, R. F. **Biomecânica da Lesão músculoesquelética**. Ed. Guanabara Koogan, 94-97, 2001.

YASUDA, T. Cartilage destruction by matrix degeneration products. **Med Rheum.** 16, 197-205, 2006.

ARTIGO

**“RECUPERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR APÓS APLICAÇÃO DE UM
PROTOCOLO DE ALONGAMENTO MUSCULAR PASSIVO”**

**RECUPERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR APÓS APLICAÇÃO DE UM
PROTOCOLO DE ALONGAMENTO MUSCULAR PASSIVO**

C. N. K. Dias, A. F. Renner, A. A. Santos, F. Valsilceac, S. M. G. Mattiello-Rosa

**Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP,
Brasil.**

S. M. G. Mattiello-Rosa

Deperatamento de Fisioterapia

UFSCar

13565-905 São Carlos, SP

Brasil

Fax: + 55-16-3351-8039

e-mail: stela@power.ufscar.br

Resumo

Objetivo: Avaliar a recuperação da cartilagem da articulação talocrural de ratos quando submetidos à um protocolo de alongamento muscular cíclico pós-imobilização.

Material e Métodos: 40 ratos adultos foram divididos em 7 grupos: I - imobilizado (n=6), IR - imobilizado e 7 semanas de recuperação (n=6), IA - imobilizado e alongado (n=6), IAR - imobilizado-alongado e 7 semanas de recuperação (n=6), A - alongado (n=6), AR - alongado e 7 semanas de recuperação (n=6) e C - controle (n=5). Para realizar a imobilização os animais foram anestesiados com injeção intra peritoneal de Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg). O modelo de imobilização utilizado foi o de Coutinho et al (2002), e a imobilização foi mantida por quatro semanas consecutivas. Após esse período a imobilização foi retirada e os animais foram submetidos ao protocolo de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, onde a articulação talocrural esquerda foi mantida em flexão dorsal máxima, manualmente, por 60s intercalados com 30s de relaxamento com dez repetições, por sete dias na semana, durante três semanas. As articulações foram descalcificadas e processadas em parafina e coradas por Hematoxilina e Eosina. Foram avaliadas as alterações morfológicas segundo Mankin et al (1971) e realizada morfometria (espessura da cartilagem e contagem de células).

Resultados: Não houve alteração de espessura total da cartilagem articular entre os grupos na pata tratada e na não tratada. O grupo controle apresentou a espessura da cartilagem calcificada significativamente maior que todos os outros grupos. O grupo IA mostrou uma quantidade de células e presença de clones na pata tratada significativamente maior em relação ao grupo IR, e na pata não tratada foi maior que os grupos C, IR e AR.

Conclusão: As células da cartilagem articular aumentam em número e presença de clones frente ao estímulo de alongamento após a imobilização, e quando a recuperação do período de imobilização é feita em livre movimentação, estas tendem a retornar às condições prévias a imobilização, sugerindo uma melhor recuperação celular.

Abstract

Objective: To evaluate the recovery of ankle articular cartilage of rats after applying unilateral cyclic passive muscle stretching protocol in previously hindlimb immobilization.

Methods: forty *Wistar* rats were divided in seven groups: C- control; I- immobilized ; RI- seven weeks recovery after immobilization; S- Stretched; RS- seven weeks recovery after stretch; IS- immobilized and stretched; ISR- immobilized-stretched and seven weeks recovery. The left ankle joint from the groups I, RI, IS and ISR were immobilized for 4 week. In the muscle stretching protocol the left ankle joint was maintained manually full dorsal flexed, 10 times for 60s with a 30s rest between each stretch, seven days a week for three weeks, to stretch the ankle plantar flexors muscle of groups IS, S, ISR and SR. The right ankle joint were free to move. After this intervention period, the rats of RI, RS, ISR groups was free to move for recovery during seven weeks. At the end of experiment, the animals were sacrificed and the ankles were removed, decalcified and processed in paraffin, and stained with Hematoxilin-Eosin. Two blinded observers evaluated morphologic changes by Mankin score. A morphometric study was carried out using a hand count of chondrocytes cells and cartilage thickness measurements.

Results: No changes in all thickness was found. The C group had the calcified cartilage bigger than the other groups. The IS group had in your treated limb more cells and clonings than the IR group, and in the non-treated more cell and clonings than the C, RI and SR groups.

Conclusions: The muscle stretching after immobilization increases the number of chondrocytes and the presence of cloning, and when free movement is allowed during the recovery period from immobilization, the chondrocyte characteristics tend to return to those present before immobilization, suggesting better cellular recovery.

Introdução

O alongamento muscular é um recurso terapêutico amplamente usado na prática esportiva, assim como para reabilitação de sistema músculo-esquelético, principalmente após procedimentos de imobilização.

A imobilização articular é um recurso importante no tratamento de diversas afecções do sistema músculo-esquelético. Vanwanseele, Lucchinetti e Stüssi, (2002) classificam as alterações que ocorrem na cartilagem articular decorrentes da imobilização como degenerativas.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o desenvolvimento, manutenção e degeneração da cartilagem articular são regulados por fatores mecânicos como carga e movimento, os quais são necessários para síntese e manutenção de componentes da MEC da cartilagem articular (LAMMI, 2004). Na ausência de carga ou de estímulo mecânico ocorre uma rápida deterioração de suas propriedades bioquímicas e biomecânicas (LEROUX et al, 2001). Sabe-se que após imobilização da articulação ocorrem mudanças atróficas e diminuição na espessura da cartilagem articular, principalmente na região não calcificada (VANWANSEELE, 2003). Tais alterações resultam em quiescência de síntese neste tecido e depleção de glicosaminoglicana sulfatada (GAGs). No entanto, essas alterações, combinadas com rede de fibras colágenas intactas, não são suficientes para iniciar a deterioração da cartilagem (HAAPALA et al, 1999).

O ganho de movimento articular é usado nos protocolos de reabilitação, principalmente depois de um período de imobilização. Após a retirada da imobilização, os procedimentos terapêuticos para a recuperação do movimento, são variados como exemplo a remobilização, o exercício físico e o alongamento muscular. Porém, as alterações morfológicas, bioquímicas e metabólicas na cartilagem articular decorrentes das terapêuticas utilizadas, ainda não são conclusivas (LEROUX et al, 2001; NARMONEVA

et al, 2002). O alongamento muscular como forma de remobilização é muito utilizado na prática clínica, entretanto poucos estudos na literatura avaliaram a resposta da cartilagem ao alongamento muscular. De acordo com Ikemoue et al. (2003), o alongamento muscular promove compressão em diferentes magnitudes e duração durante a extensão do movimento, sendo que a resposta da cartilagem articular à carga depende basicamente da duração e magnitude dessa compressão. Condrócitos respondem a essa aplicação de carga pela alteração de seu estado metabólico (MORBASHERI et al, 2002). O estímulo mecânico compressivo aumenta a atividade metabólica dos condrocitos e o conteúdo de proteoglicanas na matriz, além de causar, a longo prazo, rigidez na cartilagem (ECKSTEIN et al, 2005).

Aroski et al, (2000) afirmaram que o alongamento muscular é prejudicial para a cartilagem previamente imobilizada, pelo fato da compressão contínua diminuir a síntese de proteoglicanas e causar lesão do tecido e necrose. Em estudo prévio Renner et al. (2006), avaliaram os efeitos do alongamento muscular, após um período de imobilização em tornozelos de ratos. Eles observaram que a imobilização provocou modificações bioquímicas, identificadas pela alteração de proteoglicana na matriz e mudanças morfológicas como presença de clones. Já nos animais que tiveram seus músculos alongados, após a imobilização, estes também apresentaram alterações morfológicas, mas com relação ao número de condrocitos, além da perda de proteoglicanas na cartilagem, mostrando assim que houve um déficit metabólico e estrutural acentuados pelo uso do alongamento muscular.

Entretanto, cessado o tratamento proposto seja remobilização, exercício físico ou alongamento, ainda é desconhecida a resposta adaptativa da cartilagem, no período conhecido como recuperação. Não se sabe se as alterações celulares e bioquímicas decorrentes da imobilização seguida de alongamento muscular serão mantidas, podendo

evoluir para um processo degenerativo e irreversível. Diante da escassez de estudos que analisam o período de recuperação da cartilagem após a remobilização, julgamos necessário verificar as possíveis mudanças da cartilagem articular nesse período, quando submetida a um protocolo de alongamento muscular após a imobilização.

Material e Métodos

Grupo Experimentais

O presente estudo foi aprovado e segue as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo: CEEA – 015/2006). Quarenta ratos *Wistars* pesando $207,83 \pm 30,04$ foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12h de ciclo claro/escuro), com livre acesso à água e ração peletizada. Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos: I - imobilizado (n=6), IR - imobilizados e 7 semanas de recuperação (n=6), IA - imobilizado e alongado (n=5), IAR - imobilizado-alongado e 7 semanas de recuperação (n=6), A - alongado (n=6), AR - alongado e 7 semanas de recuperação (n=6) e C - controle (n=5).

Protocolo de Imobilização

Os animais dos grupos I, IR e IA e IAR foram previamente anestesiados com injeção intra peritoneal de Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg). O modelo de imobilização utilizado foi o descrito por Coutinho et al (2002). A articulação talocrural esquerda foi imobilizada em máxima flexão plantar com fita adesiva e, em seguida, foi colocado o modelo imobilização. A articulação direita permaneceu livre e a imobilização foi mantida por quatro semanas consecutivas. Após esse período a imobilização foi retirada dos três grupos.

Técnica de Alongamento Muscular Passivo Intermitente

Os animais do grupo IA, A, AR e IAR foram submetidos ao protocolo de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda. Todos os animais foram anestesiados antes da aplicação das sessões de alongamento. A articulação talocrural esquerda foi mantida em flexão dorsal máxima, manualmente, por períodos de 60s intercalados com 30s de relaxamento com dez repetições, por sete dias na semana, durante três semanas. A partir deste período, os grupos imobilizados permaneceram livres na gaiola por 3 semanas e então foram sacrificados, assim com os animais dos grupos imobilizado e alongado e do grupo alongado. Os animais dos grupos imobilizado e 7 semanas de recuperação, imobilizado-alongado e 7 semanas de recuperação e alongado e 7 semanas de recuperação permaneceram livres na gaiola por mais 7 semanas e então foram eutanasiados para coletas das articulações e análise dos dados.

Retirada das articulações do tornozelo

Após a eutanásia dos animais, ambos os tornozelos foram removidos e as articulações fixadas em formol 4% durante 48 horas.

Preparo das peças para Análise Histológica

Os tornozelos foram submetidos à descalcificação em Ácido Nítrico 7,5% acrescido de glicerina na mesma concentração durante, aproximadamente, 30 dias. Posteriormente, os tornozelos direito (não tratado) e esquerdo (tratado) foram desidratados e emblocados em parafina. Foram feitos no total 12 cortes no sentido antero-posterior da articulação, sendo os 6 primeiros com espessura de 5 μ m e equidistantes em 50 μ m. Posteriormente, o bloco foi desbastado em 600 μ m e mais seis cortes foram retirados, respeitando o mesmo

procedimento do primeiros cortes. Essa técnica foi utilizada para que pudéssemos obter amostras tanto da parte lateral como da parte medial dos tornozelos.

Procedimento de avaliação dos cortes histológicos

Os cortes foram corados por H&E. As lâminas foram avaliadas por dois avaliadores cegados através de microscopia de luz (Axiolab Zeiss) para análise da celularidade (fig 1) e presença de clones de condrócitos (fig 2). O tecido foi avaliado ao longo de toda sua extensão, partindo de um menor aumento (5X) até um maior aumento (40X).

Para análise morfológica, por microscopia de luz, foi utilizada a graduação histológica de Mankin et al (1971) quanto a celularidade e clones de condrócitos (tabela1).

Tabela 1: Sistema de graduação para avaliação da cartilagem articular
Escala de Mankin et al, 1971.

I CELULARIDADE	
Normal	0
Hiper celularidade	1
Difusa hiper celularidade	2
Hipo celularidade	3
II CLONES DOS CONDRÓCITOS	
Ausência	0
Pares Ocasionais	1
Densos pares de clones	2
Agrupamentos de Clones	3

Análise histomorfométrica

Para análise morfométrica foi utilizado o softwear Axiovision 3,1 (Carl Zeiss) para determinar a espessura da cartilagem total, espessura da cartilagem calcificada e espessura da cartilagem não calcificada, além da celularidade. Um campo central foi eleito em cada corte e analisada a espessura total central. A partir da marcação central, duas medidas

foram feitas, sendo 300 μm a direita e o mesmo valor a esquerda, como ilustra a figura 3. A espessura da cartilagem total foi realizada a partir do osso subcondral até a superfície do tecido (fig.3); a espessura da cartilagem calcificada foi definida a partir do osso subcondral até a Tidemark (fig 4A) e espessura da cartilagem não calcificada partiu da Tidemark até a superfície da cartilagem (fig. 4B). Desta forma, foram totalizadas três medidas de espessuras. Os condrócitos foram contados manualmente numa área central de 40.000 μm^2 , incluindo a camada calcificada e a superfície articular (fig.5).

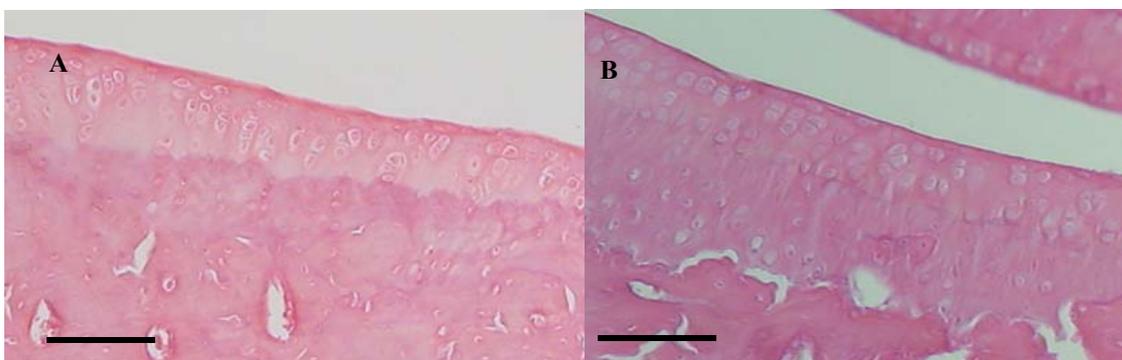


Fig. 1 – Fotomicrografia da cartilagem articular da tíbia distal (H&E) em maior aumento. (A) Celularidade normal - grupo C; (B) Hipercelularidade - grupo AR, pata não tratada (Barra = 100 μm).

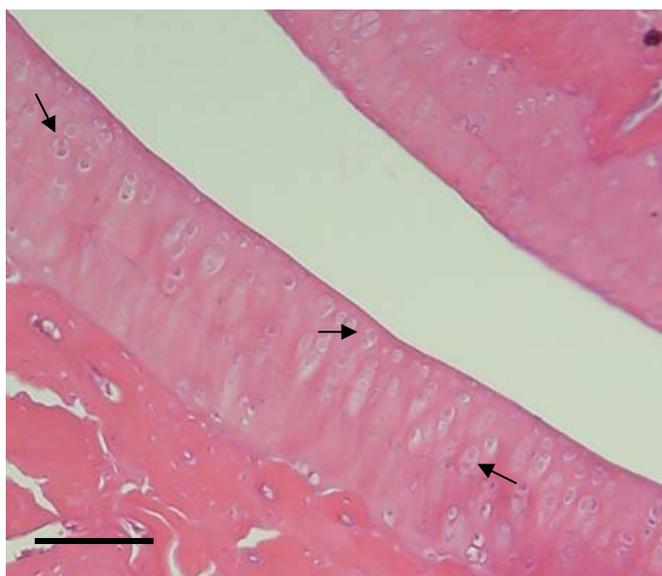


Fig. 2 - Fotomicrografia da cartilagem articular da tíbia distal (H&E) em maior aumento, com pares de clones (Barra = 100 μm).

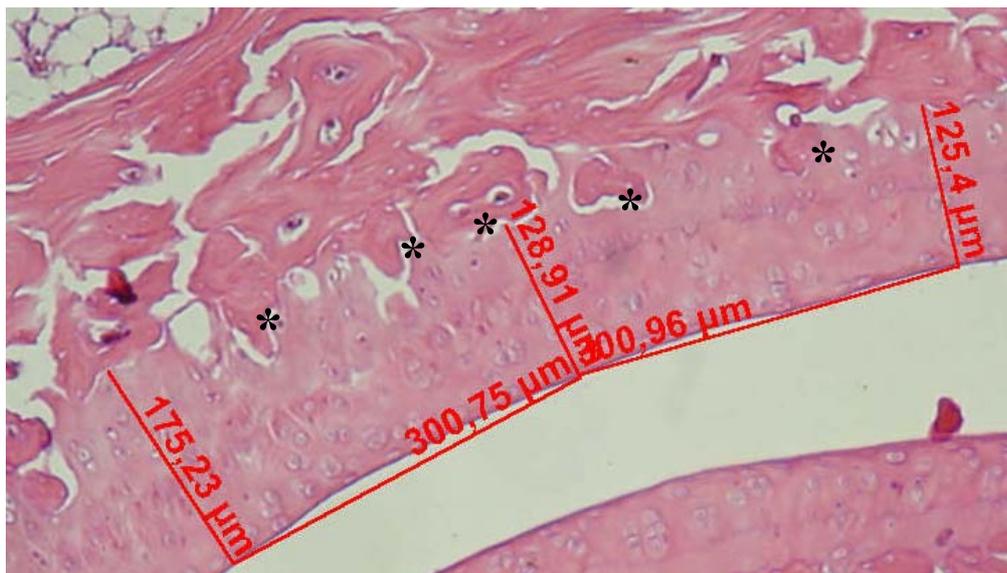


Fig. 3 – Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, mostrando o método de análise das médias das espessuras total da cartilagem, medidas a partir da interface do osso subcondral até a superfície da cartilagem articular. Os * mostram as invaginações do osso subcondral em direção à cartilagem calcificada.

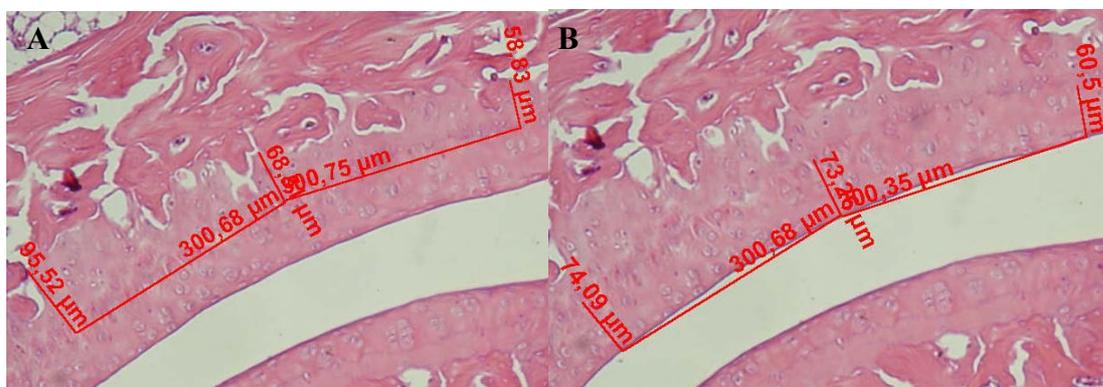


Fig 4. Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, mostrando o método de análise da espessura (A) da cartilagem calcificada, medida a partir da interface do osso subcondral até a Tidemark e (B) da cartilagem não calcificada, medida a partir da Tidemark até a superfície da cartilagem articular.

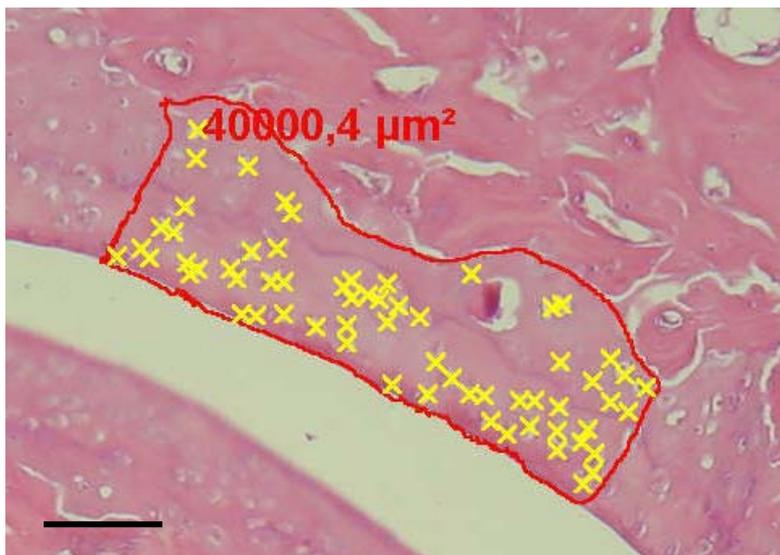


Fig. 5 - Fotomicrografia da cartilagem articular da tibia distal (H&E) em maior aumento, mostrando o método de análise morfológica para contagem manual de células, manualmente dentro de uma área central de $40.000\mu\text{m}^2$ (Barra = $100\mu\text{m}$).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste estatístico de Shapiro-Wilk para testar a normalidade das variáveis estudadas e o teste de Levene ($p \leq 0,05$) para avaliar a homogeneidade dos dados. Como todos os dados foram normais e homogêneos para a comparação da pata tratada entre os diferentes grupos e pata não tratada foi utilizado o teste ANOVA *One Way* com *post hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$). Para avaliar as diferenças entre a pata tratada e a pata não tratada intra-grupos, assim como para analisar a diferença entre a cartilagem calcificada e não calcificada intra-grupos foi utilizado o Test t pareado.

Resultados

Clone dos condrócitos

Como mostra da figura 6, o grupo IA apresentou maior grau de clones de condrócitos em relação a todos os grupos, tanto na pata tratada como na pata não tratada. Porém essa diferença foi estatisticamente significante somente na pata não tratada do grupo IA em relação ao grupo AR e na pata tratada do grupo IA, em relação ao grupo A. O grupo IA apresentou predominância de pares ocasionais de clones (Grau 1 segundo a escala de Mankin et al, 1971). Não houve diferença estatística entre as patas tratadas e não tratadas em nenhum intra-grupo.

Celularidade

As células dos grupos I, A e IA apresentaram-se ligeiramente aumentadas e desorganizadas nas diferentes camadas do tecido, tanto na pata tratada como na pata não tratada. Com relação à pata tratada, os grupos C e A não foram diferentes entre si, porém apresentaram grau de células menor que todos os outros grupos. Já o grupo I apresentou maior grau de células em relação a todos os grupos menos o grupo IAR. O grupo IAR, além das diferenças acima citadas, teve grau de células significativamente maior que os grupos IR e AR. Com relação á pata não tratada, o grupo C obteve grau significamente menor que os grupos que foram mantidos em recuperação (IR, AR e IAR) e o grupo I. O grupo A obteve menor grau de células que os grupos que foram mantidos em recuperação (IR, AR e IAR) Não houve diferença significativa entre o grau de células das patas tratadas e não-tratadas intragrupos (Fig. 7).

Análise Morfométrica

Celularidade

A contagem dos condrócitos mostrou que não houve diferença na quantidade de células entre as patas tratadas e não tratada em nenhum grupo. A pata não tratada do grupo IA teve uma quantidade significativamente maior de células que os grupos C, IR e AR, assim como a pata tratada foi significativamente maior que o grupo IR. Não houve diferença na quantidade de células entre as patas tratadas e não tratada em nenhum outro grupo (Fig. 8).

Espessura Total da Cartilagem

Os grupos I, A, IA, IR, AR e IAR apresentaram invaginações do osso subcondral em direção à cartilagem calcificada (fig. 3). Nenhuma diferença nas medias das espessuras foram encontradas comparando-se as patas tratadas e não tratadas e entre os diferentes grupos (fig. 9).

Espessura da Cartilagem Calcificada

As patas tratadas mostraram espessura da cartilagem calcificada significativamente menor em todos os grupos em relação ao grupo C (Fig. 9).

Espessura da Cartilagem Não-Calcificada

Não houve diferença estatística entre as espessuras da cartilagem calcificada das patas tratadas entre os grupos (fig. 9).

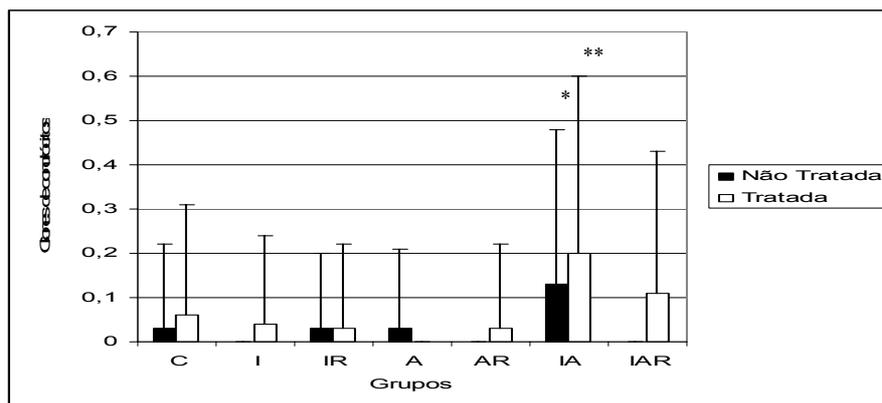


Fig. 6 – Média do escore de graduação de presença de clones dos diferentes grupos. Na pata tratada o grupo IA obteve menor grau de clones em relação ao grupo A. Na pata não tratada o grupo IA teve menor grau de clones em relação à pata não tratada do grupo AR. O grupo IA apresentou predominância de pares ocasionais de clones (Grau 1 segundo a escala de Mankin et al, 1971). Não houve diferença estatística entre as patas tratadas e não tratadas intragrupo. As significâncias foram:

Pata não tratada:

* IA e AR ($p = 0,032$).

Pata tratada:

** IA e A ($p = 0,046$).

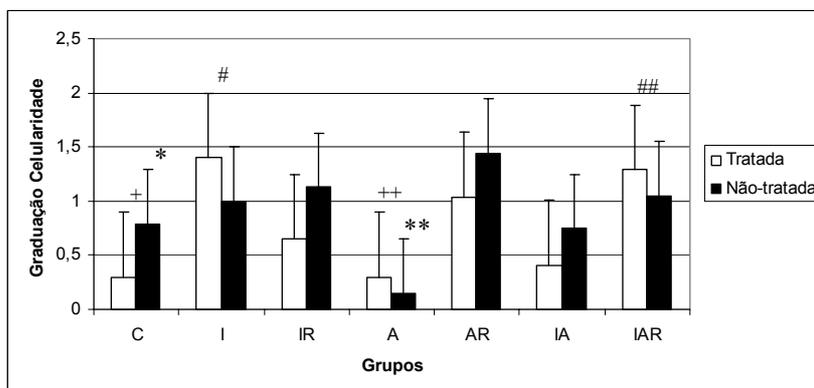


Fig. 7 – Média do escore de graduação da celularidade dos diferentes grupos. Na pata tratada, os grupos C e A não foram diferentes entre si, porém apresentaram grau de células menor que todos os outros grupos. O grupo I apresentou maior grau de células em relação a todos os grupos menos o grupo IAR. O grupo IAR, além das diferenças já citadas, teve grau de células significativamente maior que os grupos IR e AR. Na pata não tratada, o grupo C obteve grau significativamente menor que os grupos IR, AR, IAR e I. O grupo A obteve menor grau de células que os grupos IR, AR e IAR. Não houve diferença significativa entre o grau de células das patas tratadas e não-tratadas intragrupos. As significâncias foram:

Pata não tratada:

* C e AR ($p = 0,000$), C e IR ($p = 0,001$), C e IAR ($p = 0,005$), C e I ($p = 0,019$);

** A e IR ($p = 0,005$), A e AR ($p = 0,002$), A e IAR ($p = 0,020$), A e IAR ($p = 0,000$);

Na pata tratada:

+ C e I ($p = 0,000$), C e IA ($p = 0,009$) e C e IAR ($p = 0,00$), C e IR ($p = 0,004$), C e AR ($p = 0,011$);

++ A e IA ($p = 0,032$), A e I ($p = 0,000$), A e IR ($p = 0,014$), A e AR ($p = 0,038$), A e IAR ($p = 0,000$);

I e IR ($p = 0,049$), I e AR ($p = 0,009$);

IAR e IR ($p = 0,028$), IAR e AR ($p = 0,005$).

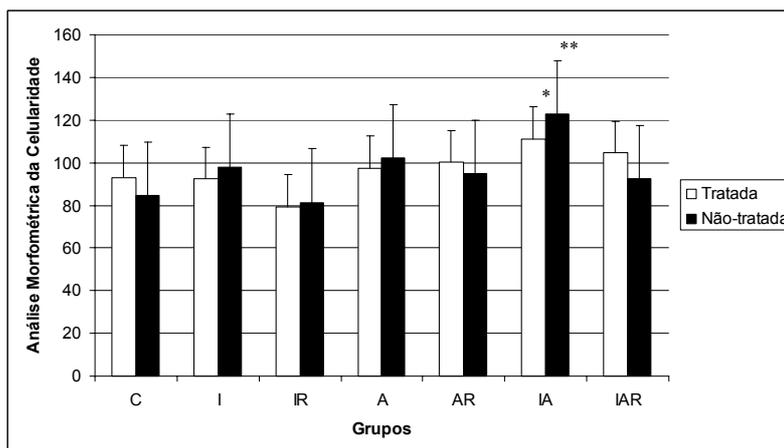


Fig. 8 – Médias do número de células presentes na cartilagem dos diferentes grupos. O grupo IA apresentou maior celularidade na pata não tratada comparado aos grupos C, IR e IAR, e na pata tratada apresentou celularidade aumentada apenas comparado ao grupo IR. Não houve diferença entre as patas tratadas e não tratadas em nenhum grupo. As significâncias foram:

* pata tratada do IA e pata tratada do IR ($p = 0,022$),

** pata não tratada do IA e pata não tratada do C ($p = 0,006$), pata tratada do IA e pata tratada do IR ($p = 0,000$)

e pata tratada do IA e pata tratada do AR ($p = 0,43$).

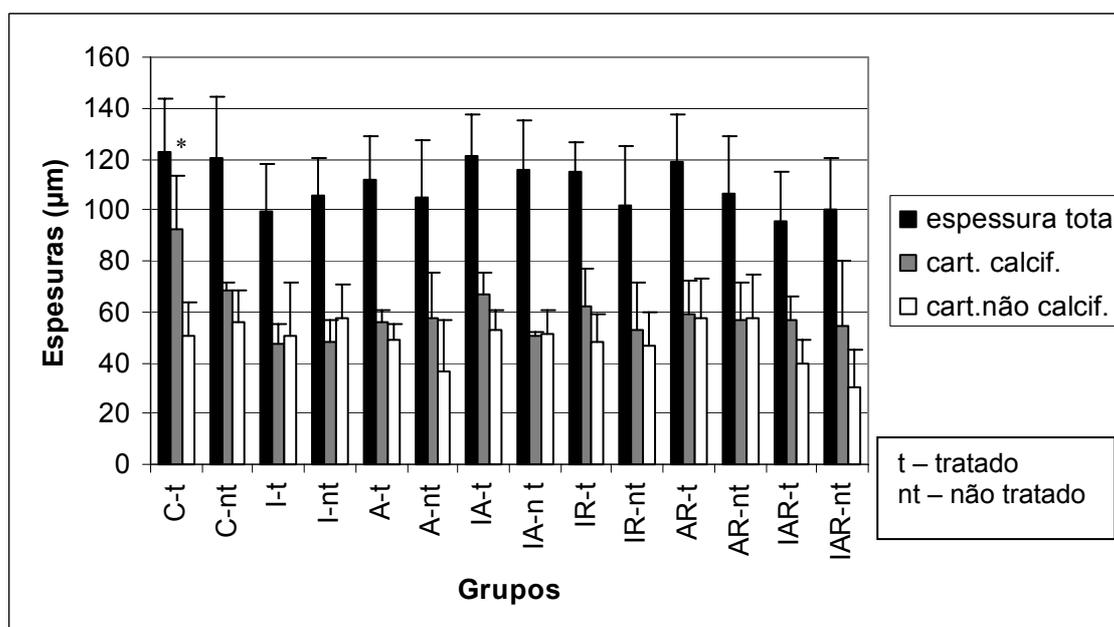


Fig. 9 – Média das espessuras da cartilagem total, da cartilagem calcificada e da cartilagem não calcificada dos diferentes grupos. Não houve diferença das espessuras total e da cartilagem não calcificada em nenhum grupo, assim e entre as patas tratadas e não tratadas. O grupo C obteve a cartilagem calcificada maior que todos os outros grupos. As significâncias foram:

* C e I ($p = 0,000$); C e A ($p = 0,006$); C e IA ($p = 0,042$); C e IR ($p = 0,013$); C e AR ($p = 0,004$) e C e IAR ($p = 0,005$)

Discussão

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que a morfologia e função da cartilagem articular modificam-se durante o período de recuperação.

A cartilagem articular é um tecido que responde a carga aplicada sobre ele, assim o alongamento muscular, como modo terapêutico, pode promover compressão em diferentes magnitudes e duração, durante a amplitude do movimento de uma articulação. Desta forma, os condrócitos respondem a aplicação de carga, pela alteração de seu estado metabólico (MOBASHERI et al, 2002). Sabe-se que sob situações de carga na cartilagem articular, os condrócitos se deformam e essa deformação influencia direta ou indiretamente a atividade metabólica das células e conseqüentemente a saúde da cartilagem articular (CLARK et al, 2006; GRODINSKY et al, 2000). Estudos prévios realizados por Renner et al (2006) mostraram que somente o alongamento muscular não apresentou diferenças em relação às adaptações dos condrócitos, quando comparado a um grupo controle, indicando ausência de dano ou resposta tecidual. Esses dados mostraram que o protocolo de alongamento não prejudicou a cartilagem sadia. Porém, o alongamento muscular passivo aplicado como forma de remobilização, após um período de imobilização, gera alterações degenerativas na cartilagem articular, mostrada pelo aumento da celularidade, a presença de clones de condrócitos e perda do conteúdo de proteoglicanas na matriz extracelular, mostrando um déficit metabólico e estrutural. No presente estudo, houve um aumento da celularidade e presença de clones na pata tratada do grupo imobilizado e alongado em relação ao grupo imobilizado e recuperado, caracterizando uma resposta metabólica celular da cartilagem ao estímulo do alongamento após o período de imobilização. Estes resultados mostraram que as alterações estruturais da cartilagem articular decorrentes da imobilização são melhor recuperadas quando o animal é mantido em livre deambulação em relação à aplicação de alongamento muscular após a imobilização. Aroski et al, (2000) afirmaram que o estímulo

compressivo é prejudicial para a cartilagem previamente imobilizada, pelo fato da compressão contínua diminuir a síntese de proteoglicanas e causar lesão do tecido através de necrose, entretanto o estudo não avaliou o período de recuperação.

Segundo Vanwanseele, Lucchinetti e Stüssi (2002), a composição e propriedade mecânicas da cartilagem se adaptam ao estímulo mecânico imposto a ela. A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa crônica, com lenta e progressiva destruição da cartilagem articular, resultante da falha do condrócito em manter o anabolismo e catabolismo do tecido (POOLE, 2001). Kuettner e Cole (2005), que investigaram as diferentes incidências de OA entre as articulações do joelho e tornozelo, encontraram que o tornozelo possui uma alta rigidez compressiva e menor espessura cartilaginosa em relação ao joelho. Essa diferença morfológica protege a cartilagem do tornozelo de microtraumas contínuos sofridos por ele. Os condrócitos do tornozelo têm alta capacidade de reagir com agentes anabólicos, sendo assim capaz de reparar as lesões da cartilagem logo em seu início. Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo imobilizado e posteriormente alongado quando permaneceu em livre deambulação durante 7 semanas para recuperação, teve seu número de células reduzido aos níveis do grupo controle, apontando uma possível recuperação estrutural da cartilagem articular, corroborando com Kuettner e Cole (2005) e Vanwanseele, Lucchinetti e Stüssi (2002).

Alguns estudos como o de Clark, et al (2006), usaram a pata contralateral como controle. Porém, outros estudos, como o de Kuettner e Cole (2005) apontaram que indivíduos com alterações degenerativas no tornozelo de um membro apresentaram mudanças degenerativas em grau maior ou igual no joelho do mesmo lado. Entretanto, também observaram alterações similares no membro contralateral, sugerindo que fatores, como biomecânica alterada, responsáveis por alterações degenerativas em um membro, podem causar mudanças no membro contralateral. Os resultados do presente estudo

mostraram que mesmo nos grupos que apresentaram alterações estruturais degenerativas no membro tratado, não houve diferença significativa em relação ao membro não tratado, corroborando com o estudo citado acima, porém, o motivo desses resultados, seja por reação de compensação biomecânica, seja por alterações metabólicas sistêmicas, ainda necessitam de maiores estudos.

As alterações encontradas em relação a celularidade do tecido pela morfometria foram diferentes das encontradas pela avaliação visual dos observadores. Isso pode ser devido a diversos fatores, como a alteração da espessura da camada calcificada da cartilagem nos grupos experimentais e tamanho das células avaliadas visualmente. Thomas et al (2007) também encontraram em seus estudos, diferenças entre os dados qualitativos e quantitativos e atribuiu ao fato da análise feita pelo escore de Mankin descrever a aparência bruta da cartilagem como um todo, diferentemente de métodos de análise que avaliaram uma região específica, neste caso a morfometria de apenas uma área do corte do tecido.

A alteração da espessura do tecido cartilaginoso é um importante indicador de degeneração, uma vez que a cartilagem articular depende da composição e organização da matriz extracelular, além da relação entre matriz e condrócito, para resistir a carga mecânica (HING et al, 2002). São poucos os estudos na literatura que avaliaram a espessura das diferentes regiões da cartilagem. Kiviranta et al (1994) demonstraram que não houve nenhuma recuperação da espessura nas diferentes áreas do tecido cartilaginoso, principalmente naquelas submetidas a pouca compressão. Haapala et al. (1999) demonstraram que depois do período de remobilização, não existe diferença significativa na espessura da cartilagem. No estudo de Clark et al (2006), onde avaliaram as cartilagens articulares de gatos após 16 semanas da transecção de LCA, observaram que a cartilagem articular patelar tornou-se mais espessa, contendo condrócitos maiores e freqüentemente organizados em aglomerados, comparado com as articulações controle contra-laterais. No

presente estudo, embora tenha sido encontrado um aumento da celularidade, nenhuma alteração da espessura da cartilagem articular foi encontrada entre os diferentes grupos, para as patas tratadas e não tratadas. O resultado diferencial existente no estudo de Clark et al (2006) pode ser explicado pela diferença existente entre os tempos de recuperação. Assim, acredita-se que 7 semanas após cessado o estímulo, como foi realizado no presente estudo, não tenham sido suficientes para observar alterações quanto a espessura da cartilagem. Ainda, é sabido que lesão do LCA provoca o aparecimento de Osteoartrite, enquanto que a imobilização provoca atrofia do tecido (RENNER, et al., 2006). Porém, a espessura da cartilagem na camada calcificada de todos os grupos experimentais foram menores que o grupo controle, apresentando invaginações do osso subcondral como mostra a figura 3. Possivelmente ocorreu uma resposta do tecido frente a falta e/ou ao excesso de carga, e em 7 semanas de recuperação essas alterações ainda foram observadas. O'Connor (1997), encontrou que diferentes formas de imobilização geravam diferentes respostas da adaptação biológica do osso subcondral em relação à cartilagem articular. Vinte oito dias de imobilização não rígida não gerou diferenças entre as espessuras das camadas calcificadas e não calcificadas da cartilagem, pela reabsorção na interface condro-óssea. Entretanto, imobilização por suspensão do animal, restringindo apenas a carga no membro e mantendo a mobilidade gerou um avanço da Tidemark em direção à superfície da cartilagem, aumentando a camada calcificada da cartilagem e diminuindo a espessura a camada não-calcificada. A teoria de Carter e Wong (1988) diz que a redução da carga hidrostática cíclica causa uma inibição da tendência natural da ossificação subcondral avançar em direção à superfície articular. O presente estudo obteve resultado diferente dos estudos acima citados, já que encontrou uma redução da espessura da camada calcificada, provavelmente pela invasão do osso subcondral. Desta forma, mesmo tendo encontrado resposta do osso subcondral frente aos estímulos dados, como não encontramos diminuição

na espessura total da cartilagem, os resultados podem indicar que o tratamento proposto não tenha provocado o aparecimento da osteoartrite, já que a espessura total da cartilagem não foi comprometida.

O metabolismo celular tende a aumentar com a demanda das transformações do tecido. No entanto, na cartilagem articular as limitações quanto ao transporte de nutrientes, citocinas, metabólitos e componentes da MEC sintetizadas, dificultam esse aumento de metabolismo. Segundo Shaepherd e Seedhom (1999) dificuldades no transporte condrócito-matriz é um fator limitante no aumento da espessura da cartilagem, bem como no processo de remodelação da mesma. Infere-se, assim, que o aumento da celularidade e o excesso de metabólitos, tenha prejudicado o transporte condrócito-matriz, e por conseguinte o processo de formação da espessura da cartilagem a curto-prazo.

Os dados encontrados no presente estudo mostraram que a imobilização não gerou alterações da cartilagem articular, quanto à espessura total da cartilagem, celularidade e presença de clones, no entanto, o alongamento muscular pós-imobilização apresentou ser um estímulo prejudicial à cartilagem articular, visto que promoveu alterações em sua estrutura dado pelo aumento da celularidade e presença de clones de condrócitos sem aumentar a espessura total do mesmo. Por outro lado, a recuperação pós-imobilização em movimentação livre manteve as características morfológica normais do tecido. Portanto, sugere-se que o alongamento muscular, sendo um estímulo compressivo à cartilagem articular, deve ser mais investigado, uma vez que é largamente utilizado na prática clínica, principalmente quando aplicado após um período de imobilização.

Conclusão

Desta forma, os dados encontrados no presente estudo sugerem que as células da cartilagem articular aumentam em número e presença de clones frente ao estímulo de

alongamento após a imobilização, e quando a recuperação do período de imobilização é feita em livre movimentação, estas tendem a retornar às condições prévias a imobilização, sugerindo uma melhor recuperação celular.

Bibliografia

AROKOSKI, J. P.A.; JURVELIN, J. S.; VÄÄTÄINEN, U. et al. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scand J Med Sci Sports**. 10, 186-98, 2000.

CARTER, D. R.; WONG, M. The role of mechanical loading histories in the development of diarthrodial joints. **J Orthop Res**. 6, 804-816, 1988.

CLARK, A. L.; LEONARD, B. Sc.; BARCLAY, B. A. et al. Heterogeneity in patellofemoral cartilage adaptation to anterior cruciate ligament transaction; chondrocyte shape and deformation with compression. **Osteoarthritis Cartilage**. 14, 120-130, 2006.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N. et al. A new model for the immobilization of the rat hindlimb. **Braz J Med Biol Res**. 11(35), 1329-1332, 2002.

ECKSTEIN, F.; LEMBERGER, B.; GRATZKE, C. et al. In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. **Ann Rheum Dis**. 64, 291-295, 2005.

GRODZINSKY, A. J.; LEVENSTON, M. E.; JIN, M. et al. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical force. **Annu Rev Biomed Eng**. 2, 691-713, 2000.

HAAPALA, J.; AROKOSKI, J. P. A.; HYTTINEN, M. M. et al. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. **Clin Orthop**. 1, 218-29, 1999.

HING, W. A.; SHERWING, J. M.; ROSS, J. M. et al. The influence of pericellular microenvironment on the chondrocyte response to osmotic challenge. **Osteoarthritis Cartilage**. 10, 297-307, 2002.

IKEMOUE, T.; TRINDADE, M. C. D.; LEE, M. S. et al. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. **J Orthop Research**. 21, 110-16, 2003.

KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J. et al. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the young canine knee joint after remobilization of the immobilized limb. **J Orthop Res**. 12, 161-7, 1994.

KUETTNER, K. E.; COLE, A. A. Review: Cartilage degeneration in different human joints. **Osteoarthritis Cartilage**. 13, 93-103, 2005.

LAMMI, M. J. Current perspectives on cartilage and chondrocyte mechanobiology. **Biorheology**. 41, 593–596, 2004.

LEROUX, M. A.; CHEUNG, H. S.; BAU, J. L. et al. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis Cartilage**. 9, 633-40, 2001.

MANKIN, H. J.; DOFMAN, H.; LIPPIELLO, L. et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **J Bone Joint Surg Am**. 53, 523-537, 1971.

MOBASHERI, A.; CARTER, S. D.; MARTIN-VASALLO, P. et al. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. **Cell Biol Int**. 26, 1-18, 2002 .

NARMONEVA, D. A.; CHEUNG, H.; WANG, J. Y. et al. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in canine model. **J Orthop Res**. 20, 83-91, 2002.

O'CONNOR, K. M. Unweighting accelerates tidemark advancement in articular cartilage at the knee joint of rats. **J Bone Miner Res**. 12, 580-589, 1997.

POOLE, A. R. Cartilage in health and disease. In Koopman W (ed) **Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology**. 14th edit., Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins 226-284, 2001.

RENNER, A. F.; CARVALHO, E.; SOARES, E.; MATTIELLO-ROSA, S. M. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**. 14, 196-202, 2006.

THOMAS, C. M.; FULLER, B. V.; WHITTKES, B. et al. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. **Osteoarthritis Cartilage**. 15, 27-34, 2007.

SHEPHERD, D. E.; SEEDHOM, B. B. Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. **Ann Rheum Dis**. 58, v.1, 27-34, 1999.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concept and future directions. **Osteoarthritis Cartilage**. 10, 408-419, 2002.

VANWANSEELE, B.; ECKSTEIN, F.; KNECHT, H. et al. Longitudinal analysis of cartilage atrophy in the knees of patients with spinal cord injury. **Arthritis Rheum**. 48, 3377–3381, 2003.