



*Universidade Federal
de São Carlos*

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

**O EFEITO DE UM PROTOCOLO DE ALONGAMENTO
MUSCULAR PASSIVO SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR**

Adriana Frias Renner

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos PPG-FT/UFSCAR como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia – Área de Concentração Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

Profa. Dra. Stela Márcia Gonçalves Mattiello-Rosa
Orientadora

São Carlos
2005

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

R414ep

Renner, Adriana Frias.

O efeito de um protocolo de alongamento muscular passivo sobre a cartilagem articular / Adriana Frias Renner. - São Carlos : UFSCar, 2005.
49 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fisioterapia. 2. Cartilagem articular. 3. Proteoglicanas.
4. Exercícios de alongamento. I. Título.

CDD: 615.82 (20ª)

Aos meus pais, Martin e Margarida,
pelo amor, compreensão e apoio
em todas as etapas da minha vida.

À minha irmã Mariana
pelo carinho e amizade incondicionais.

Ao meu namorado Raphael sempre ao meu lado,
trazendo um pouco de tranquilidade
aos meus momentos de ansiedade.

Agradecimento especial à Prof^ª Dr^ª Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa
pela amizade, apoio e pelos ensinamentos compartilhados
durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimentos

Às amigas e amigos Ana Carol Evangelista, Tati Gaion, Bel Muraca, Dê Marques, Meire Yamada, Carol Peretti, Cris Seffrin, Lê Koester, Cris Feoli, Débi Miranda, Neto Moreschi, Mel Pacheco e Fugi Fugimoto pelo apoio e amizade.

À Marilene Castiglia pela amizade.

Aos colegas de laboratório e amigos do cafezinho Anna, Thiago, Lucia, Jã, Eli, Fabinho, Quel, Sá, Paulo, Paula, Dório e Tereza. Sempre é boa a hora do cafezinho...

À colega e “aluna” Elaine pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho.

À amiga sempre disposta a ajudar Anna Raquel pelas dicas, orientações e ombro amigo.

À colega e amiga Eli pelas figuras e ajuda na estruturação do trabalho.

À amiga Clarissa Slongo Coiro pelo apoio e incentivo a esta e outras conquistas.

Ao Prof. Dr. José Roberto Goldim pelo seu entusiasmo pelo “conhecer” e respeito pela pesquisa que me incentivaram a trilhar esse caminho.

À Prof^a. Dr^a. Tânia de Fátima Salvini pelo empréstimo do Laboratório de Plasticidade Músculo-Esquelética e apoio na realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Soares, do Departamento de Patologia da FMRP/USP, pelo espaço aberto em seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À funcionária técnica bióloga Ana Maria Rocha do Departamento de Patologia da FMRP/USP pelos ensinamentos e apoio técnico fundamentais para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Oishi, Departamento de Estatística da UFSCar, pelos ensinamentos e orientações com relação ao tratamento estatístico desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto pelo espaço aberto em seu laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia pelos ensinamentos ao longo das disciplinas cursadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos para realização desse trabalho.

Sumário

Agradecimentos	iii
Sumário	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	3
3. Revisão da literatura.....	4
3.1 <i>Cartilagem Articular: características estruturais e fisiológicas.</i>	<i>4</i>
3.2 <i>Propriedades Mecânicas.....</i>	<i>8</i>
3.3 <i>Lesão e Reparo da Cartilagem</i>	<i>9</i>
3.4 <i>Alterações na Cartilagem Resultantes de Imobilização Articular.....</i>	<i>11</i>
3.5 <i>Respostas da Cartilagem Resultantes da Remobilização Articular.....</i>	<i>13</i>
3.6 <i>Modelos de avaliação do dano à cartilagem articular.....</i>	<i>15</i>
4. Material e Métodos	17
4.1 <i>Animais.....</i>	<i>17</i>
4.2 <i>Grupos Experimentais.....</i>	<i>17</i>
4.3 <i>Pesagem dos animais</i>	<i>18</i>
4.4 <i>Protocolo de Imobilização</i>	<i>18</i>
4.5 <i>Técnica de Alongamento Muscular Passivo Intermitente.....</i>	<i>19</i>
4.6 <i>Retirada das articulações do tornozelo</i>	<i>20</i>
4.7 <i>Preparo das peças para Análise Histológica.....</i>	<i>20</i>
4.8 <i>Procedimento de avaliação dos cortes histológicos</i>	<i>21</i>
5. Análise Estatística	24
6. Resultados	25

6.1	<i>Pesos dos Animais</i>	25
6.2	<i>Correlação entre os achados dos dois observadores</i>	26
6.3	<i>Clones</i>	26
6.4	<i>Celularidade</i>	29
6.5	<i>Safranina</i>	32
7.	Discussão	35
8.	Conclusão	39
	Referências Bibliográficas	40
	ANEXO I	45
	ANEXO II	46
	ANEXO III	47
	ANEXO IV	48
	ANEXO V	49

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema do complexo agregado de proteoglicanas, formado pelo ácido hialurônico, proteína de ligação, proteoglicanas (glicosaminoglicanas sulfatadas e proteína central). Reproduzido de Felice et al, 2002.	5
Figura 2: Modelo de Imobilização utilizado. A: Parte superior de algodão, similar a uma camiseta; B: parte inferior feita com uma malha de aço com as bordas protegidas com fita adesiva; C: flexão plantar realizada com fita adesiva e finalizada com a malha de aço; D: forma final da imobilização do tornozelo. FONTE: Coutinho, EL; Gomes ANS; França C; Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. Braz. J. Med. Biol Res. (2002) 35: 1329 -1332.	19
Figura 3: Foto do procedimento de alongamento muscular.	20
Figura 4: Desenho esquemático dos cortes realizados na articulação talo crural. A: Linha divisória entre as regiões medial e lateral, vista posterior.....	21
Figura 5: Representação das médias e desvios padrão relativas à presença de clones observadas nos diferentes grupos (patas contralaterais e tratadas); conforme graduação na Tabela 2. Diferenças estatísticas relativas às comparações intergrupos. *diferença significativa entre os grupos I e IA, (p=0,014), na pata contralateral. **diferença estatística entre o grupo IA e o grupo I, A (p=0,000) e C (p=0,000), patas contralaterais. *** diferença estatística entre os grupos IA e A, (p=0,033), na comparação das patas tratadas.	27
Figura 6: Fotomicrografia da cartilagem articular, coloração H&E; A: Presença de pares de clones (seta), classificação grau 1; corte histológico de um animal do grupo I, pata contralateral; B: Cartilagem normal com relação a presença de clones, classificação grau 0 na tabela utilizada; animal do grupo C, pata contralateral. Barra = 21µm.....	28
Figura 7: Representação das médias e desvios padrão das alterações na celularidade observadas nos diferentes grupos (patas contralaterais e tratadas).	

Conforme classificação na Tabela 2. Diferenças estatísticas relativas às comparações intergrupos. * diferença significativa entre os grupos C e I (p=0,000), C e IA (p=0,000), C e A (p=0,000). ** diferença estatística entre os grupos C e I (p=0,015), C e IA (p=0,005), C e A (p=0,024). 30

Figura 8: Fotomicrografia da cartilagem articular de rato, coloração H&E. A: celularidade normal, classificação 0 na tabela, animal do grupo C; B: hiper celularidade, classificação grau 1, pata contralateral do animal do grupo I; C: hiper celularidade difusa, grau 2 pata contralateral de um animal do grupo I; D: Hipocelularidade, classificação grau 3 na tabela, pata contralateral de um animal do grupo I. Barra = 21µm. 31

Figura 9: Representação das médias e desvios padrão das perdas de intensidade de Safranina-O observadas nos diferentes grupos (patas contralaterais e tratadas). Comparações entre os diferentes grupos: *diferença significativa entre os grupos I e IA (p=0,004), I e A (p=0,000), I e C (p=0,000). **diferença estatística entre os grupos IA e A (p=0,00), IA e C (p=0,000). *diferença significativa entre os grupos I e IA (p=0,002), I e A (p=0,000), I e C (p=0,000). ****diferença significativa entre os grupos IA e A (p=0,000), IA e C (p=0,000). 33**

Figura 10: Fotomicrografia da cartilagem articular de rato, ortocromasia para Safranina-O fast green. A: cartilagem articular normal, intensa coloração para Safranina, classificação grau 0 na tabela, pata tratada de um animal do grupo C; B: perda leve da intensidade; grau 1 quando em até metade da extensão e grau 2 quando por toda a área da cartilagem articular; áreas de intensa coloração pela safranina ao redor dos condrócitos indicando maior conteúdo de proteoglicanas na região (seta), ilustração de pata tratada de um animal do grupo I; C: Perda intensa da coloração para Safranina, em uma região da cartilagem ou por toda superfície (seta), indicando perda importante de proteoglicanas na região indicando classificação grau 3; ilustração da pata contralateral de um animal do grupo I; D: perda intensa da coloração em toda extensão da cartilagem articular, grau 4, pata tratada de um animal do grupo IA. Barra = 21µm. 34

Índice de Tabelas

Tabela 1: Esquema dos grupos experimentais com os procedimentos correspondentes.....	18
Tabela 2: Critérios de avaliação dos níveis de lesão da cartilagem articular, a partir dos Sistemas de Graduação Histológico-Histoquímico para cartilagem articular de Mankin et al (1971) e LeRoux et al (2001) modificados.	23
Tabela 3: Pesos dos animais (g) no início e no final do experimento.....	25

Lista de Abreviaturas

OA	Osteoartrite
GAGs	Glicosaminoglicanas não sulfatadas
IGF-1	Fator de crescimento insulínico tipo 1
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
BMP 2	Proteína morfogênica óssea 2
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteases
MMPs	Matris Metaloproteases
IL-1	Interleucina 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
H&E	Hematoxilina e eosina

Resumo

Objetivo: Este estudo avaliou a resposta da cartilagem articular do tornozelo de ratos, após aplicação de um protocolo de alongamento muscular passivo cíclico em animais previamente submetidos à imobilização. **Materiais e Métodos:** Para isso foram utilizados 22 ratos albinos adultos jovens ($280 \pm 25,4$ g) distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: imobilizado (I), n=6, imobilizado e alongado (IA), n=5, alongado (A), n=6 e controle (C), n=5. Nos grupos I e IA foi utilizado um modelo de imobilização que manteve a pata posterior esquerda imobilizada com o tornozelo, deste membro, em flexão plantar máxima por quatro semanas (pata tratada). Enquanto a pata posterior direita (contralateral) e as anteriores permaneceram livres para o movimento. Após a retirada do aparato de imobilização os grupos IA e A foram submetidos ao protocolo de alongamento muscular por três semanas. Seus tornozelos esquerdos foram manualmente mantidos em flexão dorsal máxima (10 repetições com 60s de duração, intercalados com 30s de relaxamento, sete dias da semana). Após as sete semanas do experimento, os tornozelos foram retirados, processados em parafina, seccionados e corados com Hematoxilina-Eosina e Safranina-O. Dois observadores graduaram os achados histológicos e histoquímicos relativos a celularidade, presença de clones e ortocromasia para Safranina-O. As avaliações foram cegas. Para isso foi elaborada uma tabela de pontuação, com nível crescente de lesão, adaptada de dois sistemas de graduação para dano a cartilagem articular descritos na literatura (Mankin et al, 1971 e LeRoux et al, 2001). Os testes estatísticos não paramétricos utilizados foram: Spearman, Kruskal-Wallis com Post Hoc Newman-Keuls e Wilcoxon, considerando grau de significância de 5%. **Resultados:** As patas tratadas do grupo submetido ao alongamento após a imobilização apresentaram significativamente maior perda do conteúdo de proteoglicanas que as do grupo somente imobilizado. Entretanto o alongamento não gerou alterações teciduais das variáveis estudadas nas patas tratadas dos grupos que não foram previamente imobilizados. **Conclusão:** Esses dados sugerem que o protocolo de alongamento utilizado nesse estudo foi prejudicial somente à cartilagem articular previamente imobilizada.

Palavras-chave: cartilagem articular, proteoglicanas, alongamento muscular, fisioterapia.

Abstract

Objective: The aim of this study is to evaluate the articular cartilage alterations of rat ankles, after applying unilateral cyclic passive muscle stretching protocol for three weeks in previously immobilized rats. **Materials and Methods:** Twenty-two male albino rats (280 ± 25.4 g) divided into four groups: I-immobilized (n=6), IS-immobilized and stretched (n=5), S-stretched (n=6) and C-control (n=5), were used in this experiment. In the immobilization protocol (groups I and IS) the left ankle joints were immobilized in full plantar flexion and this immobilization device was kept on for four weeks. The animal was allowed free cage activity with the device. In the muscle stretching protocol (groups IS and S) the left ankle joint was manually full dorsal flexed 10 times for 60 seconds with a 30s interval between each 60 second period, seven days a week for four weeks, to stretch the ankle plantar flexors muscle group. At the end of the experiment, the ankles were removed, processed in paraffin, cut and stained with Hematoxylin-Eosin and Safranin-O. Two blinded observers graduated histological and histochemical findings related to cellularity, chondrocyte cloning and Safranin-O staining, observed through light microscopy. For histological and histochemical grading, the Mankin et al (1982) and LeRoux et al (2001) modified grading system was used. For statistical analysis it was used the Spearman test, Kruskal-Wallis non-parametric test with the Post Hoc Newman Keuls and Wilcoxon non-parametric test. **Results:** The previously immobilized stretching group (treated limbs) presented a significantly higher reduction of proteoglycans content than the solely stretched and solely immobilized groups. No significant effect of muscle stretching on treated limbs concerning cellularity and chondrocyte cloning parameters was detected. **Conclusion:** These findings suggest that the stretching protocol used was harmful to the previously immobilized articular cartilage. However, the same stretching protocol did not harm the cartilage of non-immobilized groups. **Keywords:** articular cartilage, proteoglycans, muscle stretching, physical therapy.

1. Introdução

A degeneração da cartilagem articular e alterações em outros tecidos articulares podem causar dor e diminuição na amplitude de movimento. O desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento de doenças articulares prescinde de um maior entendimento das relações de uso/desuso e degeneração. Situações como estresse de cisalhamento, carga estática prolongada ou ausência de carga, estimulam destruição e ossificação da cartilagem. Existe uma inter-relação entre a composição, a estrutura e a função da cartilagem articular. Portanto, qualquer doença, trauma ou alteração de sustentação de carga que afete a composição ou a ultraestrutura desse tecido pode interferir na sua capacidade funcional de sustentar, distribuir cargas e minimizar os estresses de contato.(Cohen et al, 1998; Vanwanseele et al, 2002).

Está bem descrito que a imobilização provoca alterações degenerativas na cartilagem articular (Palmoski e Brandt, 1981; Behrens et al, 1989; Vanwanseele et al, 2002). Modelos animais de imobilização têm sido amplamente utilizados para o estudo de processos degenerativos desse tecido. Entretanto algumas alterações são parcialmente reversíveis, o que torna esse modelo diferente da osteoartrite progressiva causada por outros fatores. Porém, mesmo com essas aparentes recuperações, alterações funcionais permanecem após períodos de remobilização. As alterações bioquímicas e metabólicas e suas relações com a função ainda não são conclusivas (LeRoux et al, 2001; Narmoneva et al, 2002).

Dentre as formas de remobilização, o alongamento muscular é uma modalidade terapêutica muito usada em protocolos de reabilitação. Sabe-se que compressão e carga imposta a esse tecido tem grande influência na sua estrutura, organização e fisiologia

(Arokoski et al, 2000; Carter et al, 2004). Estudos atuais têm sido realizados com a aplicação de pressão hidrostática intermitente em condrócitos *in vitro*, apresentando resultados positivos para síntese de agrecano e colágeno tipo II (Ikenoue et al, 2003). Uma forma semelhante de pressão hidrostática intermitente aplicada em humanos é o movimento passivo contínuo; observações clínicas da eficácia deste recurso foram observadas por Salter (1994).

Entretanto o efeito do alongamento muscular, muito utilizado na reabilitação, tem sido estudado apenas no tecido muscular. Quando submetemos um grupo muscular a uma posição de alongamento, essa articulação estará em amplitudes extremas comprimindo a cartilagem articular em alguns pontos. Essa compressão gera alterações na conformação da matriz, na pressão hidrostática e no fluido intersticial, que são percebidas pelos condrócitos. Eles detectam e respondem a cargas aplicadas alterando seu estado metabólico (Suh et al, 1999; Mobasheri et al, 2002). Porém, a resposta da cartilagem articular ao alongamento muscular não está descrita na literatura. Para Alter (1999), pesquisas devem ser iniciadas para averiguar as conseqüências desse tipo de carga, antes que afirmações definitivas possam ser feitas quanto aos efeitos, vantajosos ou prejudiciais, nesse tecido.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfológica da cartilagem articular do tornozelo de ratos após aplicação de um protocolo de alongamento cíclico da musculatura posterior da perna, em cartilagem articular normal e em cartilagem previamente imobilizada.

3. Revisão da literatura

3.1 Cartilagem Articular: características estruturais e fisiológicas.

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado com grande quantidade de matriz extracelular. Essa matriz é composta por uma densa rede de fibras colágenas, proteoglicanas agregadas e não-agregadas, água, sais inorgânicos e pequenas quantidades de outras proteínas, glicoproteínas e lipídios. A principal macromolécula encontrada na matriz é o colágeno (60%), tipos IX, XI, mas predominantemente do tipo II. Este colágeno fica embebido em um firme gel hidratado de proteoglicanas. A proteoglicana é formada por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) ligadas a esse núcleo. Essas proteoglicanas podem ser encontradas como monômeros e também na forma agregada. O agregado de proteoglicanas é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatada) com múltiplos monômeros de proteoglicana ligados a ele, ilustrado na Figura 1. Componentes importantes das proteoglicanas são as GAGs, formadas por polissacarídeos sulfato de condroitina e queratan sulfato (Goldring, 2000; Tyyni & Karlsson, 2000; Vanwanseele et al, 2002).

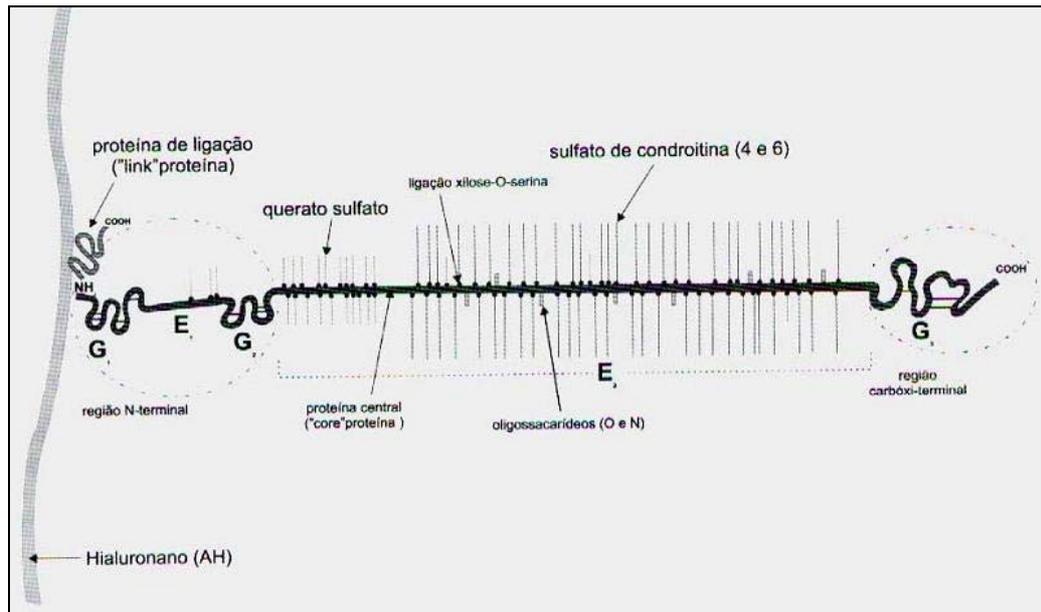


Figura 1: Esquema do complexo agregado de proteoglicanas, formado pelo ácido hialurônico, proteína de ligação, proteoglicanas (glicosaminoglicanas sulfatadas e proteína central). Reproduzido de Felice et al, 2002.

As GAGs são fortemente hidrofílicas e por isso formam géis mesmo em baixas concentrações. Além disso, possuem múltiplas cargas negativas que atraem cátions (como Na^+) que são osmoticamente ativos e fazem com que grandes quantidades de água sejam sugadas para o interior da matriz. Além disso, os monômeros de proteoglicana repelem-se por terem a mesma carga. Essas duas situações criam uma pressão de edema que é balanceada pela tensão das fibras colágenas. Por suas características, o colágeno fornece resistência a essa expansão. As proteoglicanas, além de preencherem o espaço da matriz, resistem à compressão. Sendo assim, a grande quantidade de GAGs (proteoglicanas) e colágeno permitem, respectivamente, grande pressão interna e tensão de contrabalanço, o que dá à cartilagem sua rigidez e resistência (Arokoski et al, 2000; Whiting & Zernicke, 2001; Narmoneva et al, 2002; Alberts et al, 2004).

Distribuída em lacunas entre essa matriz, existe uma esparsa população de células, os condrócitos. São eles os responsáveis pela síntese e manutenção destes componentes da matriz, produzem e degradam baseados nas citocinas anabólicas e catabólicas enviados e recebidos pela própria matriz (Goldring, 2000; Tyyni & Karlsson, 2000).

Os fatores de crescimento insulínico-1 (IGF-1) e transformador β (TGF- β) são, talvez, as citocinas anabólicas mais importantes. Entretanto, sob condições diferentes eles parecem diferenciar seus processos. IGF-1 é o maior contribuinte para a homeostase da cartilagem sob condições normais. Sob lesão ou condição de osteoartrite os condrócitos expressam, em grande quantidade, uma proteína que se liga ao IGF-1 que aos poucos diminui sua efetividade. Por outro lado, TGF- β só aumenta a síntese de proteoglicana quando a cartilagem está osteoartrítica. Outro fator de crescimento, a proteína morfogênica óssea-2 (BMP-2) também é muito importante na síntese de proteoglicanas em cartilagens saudáveis. (Angel et al, 2003).

Para degradação, os condrócitos são capazes de sintetizar uma variedade de enzimas proteolíticas como, por exemplo, as metaloproteases da matriz. A cascata proteolítica, responsável pela degradação, envolve colagenases, gelatinases e estromelinas. Suas ações são controladas pelos inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), também sintetizados pelos condrócitos. Eles inibem os efeitos catabólicos das metaloproteases. Acredita-se que a relação entre as metaloproteases e os inibidores das mesmas, é rigidamente controlada pelos condrócitos para garantir a homeostasia tecidual (Cohen et al, 1998; Vanwanseele et al, 2002).

Várias proteases vão agir na fisiologia e na fisiopatologia articular. Pertencem a quatro grupos principais: metaloproteases, serinoproteases, tiolproteases e agrecanases. As metaloproteases, por exemplo, têm papel importante tanto na remodelação do tecido conjuntivo (*turnover* e crescimento) como na patogenia de várias doenças. Na OA três grupos da família das MMPs têm um importante papel na degradação do colágeno e proteoglicana: colagenases, estromelinas e gelatinases (Felice et al, 2002).

A cartilagem articular apresenta diferentes características conforme passa da superfície a zonas mais profundas. Estas diferenças estão relacionadas com a quantidade e organização dos componentes da matriz e dos condrócitos, o que dá às camadas características biomecânicas conforme a região. Em função destas variações, divide-se a cartilagem em quatro camadas: superficial, média, profunda e calcificada. Em uma superfície articular normal, a espessura da cartilagem articular apresenta grandes

variações conforme a região.(Jurvelin et al, 1986; Tyyni & Karlsson, 2000; Vanwanseele et al, 2002).

Segundo Angel et al (2003) e Turek (1999) as divisões são:

- Zona superficial: camada mais fina e compõe 10% da cartilagem; encontra-se na superfície articular. É acelular, apresenta grandes feixes de fibras colágenas intimamente agregadas (tangenciais à superfície articular) e escassez de proteoglicanas. Essa orientação colágena tem como função uma maior resistência às forças de cisalhamento. Aprofundando a camada acelular, mas ainda considerada parte da camada superficial as células estão achatadas e elipsóides. Elas degradam proteoglicanas mais rapidamente e sintetizam menos colágeno e proteoglicanas que as camadas mais profundas. A matriz tem alta concentração de colágeno e pequena concentração de proteoglicanas como consequência do metabolismo celular. Na periferia os componentes fibrosos se fundem com o periósteo fibroso do osso adjacente.
- Zona média: localizada abaixo da camada superficial. É muito maior que a zona superficial, compõe aproximadamente 40% da cartilagem. Contém condrócitos esferóides e sua matriz com fibrilas colágenas de maior diâmetro, mas em menor concentração que na camada superficial. Suas fibrilas colágenas não estão paralelas, são anguladas em diferentes direções. Esse arranjo angulado permite que esse colágeno resista melhor às cargas compressivas. Formam um forte invólucro em forma de rede ao redor das células. Esta camada tem maior concentração de proteoglicana com menor conteúdo de água.
- Zona profunda: também compõe 40% da cartilagem e apresenta condrócitos com forma esferóide, dispostos em colunas freqüentemente em grupos de 2 a 5 células. As características ultra-estruturais dos condrócitos indicam que o grau mais elevado da atividade metabólica ocorre nas zonas média e profunda. Sua matriz contém o colágeno de maior diâmetro, a maior concentração de proteoglicanas e a menor concentração de água. As fibrilas colágenas desta camada parecem estar perpendiculares à superfície articular e se prendem à

camada mais profunda da cartilagem. A linha de crescimento é uma linha horizontal que aparece na transição entre a zona profunda e a zona calcificada.

- Zona calcificada: o volume dos condrócitos é escasso e a matriz é maciçamente impregnada por sais de cálcio. As fibrilas colágenas da camada profunda parecem se prolongar a essa camada e ancorar na zona calcificada.

3.2 Propriedades Mecânicas

De uma forma geral, as funções principais da cartilagem articular são absorver o choque, distribuir a carga ao longo da superfície articular durante a descarga de peso e permitir o deslizamento livre e suave dos movimentos. O que permite que isso ocorra são a composição, a organização, o sistema de expansão e contrabalanço existente em sua matriz extracelular e sua superfície lisa deslizante com baixo coeficiente de fricção (Turek, 1999; Felice et al 2002; Angel et al, 2003).

A orientação espacial do colágeno associada às propriedades e concentrações de suas proteoglicanas tem implicações biomecânicas. Quando não há carga na cartilagem, o fluido preenche a matriz se espalhando através da cartilagem por todo seu espaço. Entretanto quando a articulação é submetida a uma carga, a cartilagem é comprimida e sua rigidez e resiliência estão baseadas na força das macromoléculas. A permeabilidade da cartilagem permite que haja uma quantidade apropriada de fluido para permitir resistência na absorção do choque quando submetido à carga mecânica. Com o tempo, a carga cíclica enfraquece a superfície da cartilagem e reduz sua permeabilidade, impedindo o controle de fluxo de fluidos. A cartilagem passa a contar somente com a força mecânica das macromoléculas como única proteção das forças articulares (Whiting & Zernicke, 2001).

A pressão de contato aplicada diretamente na superfície articular nunca é harmônica no arco de movimento normal da articulação. Essa carga varia topograficamente; algumas áreas recebem maiores cargas. Portanto, a significância dessa carga vai depender da sua quantidade e da área da superfície para qual está sendo transmitida. Há áreas mais macias que outras (Angel et al, 2003).

A cartilagem articular lesada apresenta aumento da sua maciez. Ao aplicarmos a mesma carga compressiva em uma cartilagem fibrilada e em uma normal, a fibrilada apresentará maior maciez e maiores reentrâncias que a normal. Assim como as forças compressivas, as forças de cisalhamento, aplicadas em uma cartilagem macroscopicamente e histologicamente lesada resultam em maior deformação quanto mais macia e mais fraca estiver essa superfície. Entretanto, a diferença no tamanho desta deformação diminui quando são testadas amostras das camadas mais profundas. O conteúdo de colágeno tem relação direta com a rigidez tênsil da cartilagem. Entretanto, o mais importante é a orientação dessas fibras em direção paralela. Em maiores profundidades, não há significância entre conteúdo de colágeno e rigidez em relação às forças tensivas. A orientação perpendicular das fibras, em relação à superfície articular, é significativamente mais fraca que a orientação paralela. Já com relação às GAGs, foi estabelecido um coeficiente de correlação significativo entre a rigidez compressiva e sua concentração. Quanto maior a concentração, mais rígida é a cartilagem (Arokoski et al, 2000; Angel et al, 2003).

3.3 Lesão e Reparo da Cartilagem

A cartilagem articular não apresenta vasos sanguíneos, linfáticos nem suprimento nervoso. A falta de suprimento neurovascular é que impede o reparo da cartilagem lesada e colabora com o progresso da osteoartrite. (Huziker, 2002; Felice et al, 2002).

As lesões da cartilagem recebem diferentes respostas conforme sua profundidade. Uma lesão condral pode ser descrita tanto como superficial (parcial, até a zona média) ou ruptura completa (através de todas as camadas da cartilagem). Ambas irão reparar de maneira similar; entretanto, o defeito completo tem maior probabilidade de evoluir para osteoartrite que o parcial. Existe também o defeito osteocondral, uma lesão que penetra na cartilagem a partir da superfície articular e se estende até a placa subcondral. Na cicatrização da lesão condral não há migração de células inflamatórias, células tronco ou vascularização da rede fibrosa durante a fase de remodelamento. Estudos sugerem que a cartilagem articular pode conter algumas proteínas que inibem

essa invasão macrofágica, vascular e coagulação, ocorrendo predominantemente reparo intrínseco (Angel et al, 2003).

Os condrócitos irão migrar através da matriz, alinhar-se na parede do defeito e proliferar-se para contribuir com o reparo. Porém, esse processo apresenta suas restrições. Os condrócitos são essencialmente embebidos em suas lacunas na matriz, sua migração não é efetiva e, além disso, os únicos condrócitos disponíveis para proliferação são os que estão próximos ao defeito no momento da lesão. Outro fator é que seu grau de proliferação é muito inferior ao necessário (Felice et al, 2002).

Defeitos osteocondrais se diferenciam dos defeitos condrais no processo de reparo. No defeito osteocondral, a placa subcondral é atingida e permite que medula óssea entre no defeito. Seu reparo ocorre tanto de maneira intrínseca como de maneira extrínseca. No reparo extrínseco ocorre o influxo de células inflamatórias e citocinas produzidas na medula óssea e na sinóvia. O influxo medular contém células inflamatórias, células mesenquimais indiferenciadas e citocinas múltiplas que ativam o processo de reparo. Entretanto, também difere do reparo de outros tecidos vascularizados. Seu remodelamento produz “tecido condróide hialino” que contém uma quantidade significativa de tecido fibroso. Até hoje, nenhum estudo demonstrou qualquer processo de reparo da cartilagem que tenha produzido um tecido de igual composição ao tecido antes da lesão (Goldring, 2000; Huziker, 2002).

A base da osteoartrite é a lesão mecânica, porém estão presentes inúmeras alterações bioquímicas que contam com a participação de condrócitos, sinoviócitos tipo B (fibroblasto), enzimas e citocinas. Portanto, a OA não é o simples resultado de uma ação mecânica isolada e sim um intrincado processo, que embora sem a presença de infiltrado, pode ser classificado de inflamatório, em que participam inúmeros mediadores. Citocinas inflamatórias sinalizam bioquimicamente os condrócitos a sintetizar e secretar proteases. Aceita-se que a interleucina-1 (IL-1) seja o principal mediador que atua nos estágios precoce e tardio, e que o fator de necrose tumoral α (TNF- α) está envolvido, principalmente no início da OA (Goldring, 2000, Felice et al, 2002).

O processo é iniciado pela perda das proteoglicanas da matriz extracelular e uma ruptura na rede fibrilar colagenosa, seguido de migração dos condrócitos através dessa matriz. Os condrócitos ficam expostos a estímulos que alteram o seu comportamento metabólico. Essas células, sem a proteção da matriz, multiplicam-se no local da lesão e aumentam seus mecanismos de síntese, tentando uma regeneração. Essa tentativa é transitória, pois logo predomina a ação de proteases que iniciam, de modo progressivo, a degradação da cartilagem e a morte celular. Com a degradação, fragmentos de proteoglicanas e de colágeno caem no líquido sinovial, indo alcançar a sinóvia. Esses fragmentos passam a agir como neo-antígenos a partir da exposição de determinadas seqüências de peptídeos. Eles geram efeito irritativo estimulando sinoviócitos que passam a sintetizar citocinas catabólicas (IL-1 α , IL-1 β e TNF α). Essas vão interagir com condrócitos, estimulando ainda mais a produção de proteases. Há um aumento da degradação e cresce, proporcionalmente, a quantidade de fragmentos, que voltam a estimular as células sinoviais, fechando um ciclo que pode perpetuar o processo osteoartrítico. (Felice et al, 2002; Huziker, 2002).

3.4 Alterações na Cartilagem Resultantes de Imobilização Articular.

A imobilização provoca deteriorização de propriedades mecânicas e bioquímicas da cartilagem articular (Walker, 1998; LeRoux et al, 2001). Alguns autores classificam essas alterações como degenerativas (Säämänen et al, 1990; Okasaki et al, 1996; Walker, 1998; Vanwanseele et al, 2002). Este modelo de carga articular reduzida tem sido amplamente utilizado para o estudo do processo de degeneração desse tecido (LeRoux et al, 2001). Entretanto, deve ser notado que os achados de muitos estudos sugerem que as alterações articulares associadas com imobilização são diferentes das associadas com doença articular degenerativa (Hong & Henderson, 1996).

Para Haapala et al, (1999) a imobilização articular provoca alterações atróficas na cartilagem, retratadas pela quiescência da síntese desse tecido. O que seria diferente do estágio inicial da osteoartrite, no qual os condrócitos respondem com o aumento da expressão para síntese de proteoglicanas e colágeno. Em modelos experimentais de OA,

as primeiras alterações observadas são a diminuição das proteoglicanas superficiais, aumento do conteúdo de água e separação e desorganização da rede de fibrilas colágenas superficiais. Foi sugerido que uma vez que a integridade da zona superficial é perdida, a cartilagem abaixo fica mais exposta a estresses. Isso causaria alterações degenerativas que se estenderiam da superfície até camadas mais profundas. Entretanto, em seu estudo a depleção das glicosaminoglicanas combinada com rede de fibrilas colágenas intactas, não foi suficiente para iniciar processo degenerativo. O que o faz sugerir que a resposta à imobilização e as alterações na OA precoce são processos diferentes.

Existem muitos estudos retratando as respostas da cartilagem articular submetida a diferentes protocolos de imobilização. As alterações encontradas variam conforme o modelo animal, tipo e período de imobilização, articulação estudada e até região da articulação escolhida. Já está bem descrito que a estrutura da superfície da cartilagem articular varia de articulação para articulação e até mesmo de diferentes regiões da mesma articulação. Além disso, existem diferenças na organização da cartilagem conforme o modelo animal. Fatores esses que dificultam as comparações entre os resultados (Hong & Henderson, 1996; LeRoux et al, 2001).

De uma forma geral alterações mais comumente encontradas como resposta à imobilização são as diminuições na espessura, principalmente na região não calcificada (Walker, 1998; Haapala et al, 1999; Carter et al, 2004) e o amaciamento ou diminuição da rigidez da cartilagem (Kiviranta et al, 1994; Walker, 1998; Arokoski et al, 2000; Narmoneva et al, 2002). O amaciamento da cartilagem trás forte influência nas alterações funcionais observadas após imobilização (Narmoreva et al, 2002).

Outro achado bastante presente é a diminuição no conteúdo de proteoglicana (Säämänen et al, 1990; Okasaki et al, 1996; LeRoux et al, 2001; Carter et al, 2004). Muitos estudos utilizaram a coloração Safranina-O para avaliar essa perda (Okasaki et al, 1996; Haapala et al, 1999; Narmoreva et al, 2002). A correlação entre essa coloração e o conteúdo de proteoglicana tem sido bem documentada (Haapala, 1999). Portanto a perda da sua intensidade é um forte indicativo de diminuição do conteúdo de proteoglicanas. A diminuição dessa molécula é uma das primeiras anormalidades detectáveis após imobilização, principalmente na superfície da cartilagem articular

(Narmoreva, 2002). Essa redução tem sido explicada pelo aumento da degradação resultante da concentração aumentada das metaloproteases (Narmoreva et al, 2002). E não por reduções na síntese dessa molécula (Jortikka et al, 1997; Haapala, 2002). Parece existir um desequilíbrio no sistema síntese/degradação (Jortikka et al, 1997; Haapala et al, 2001; Narmoreva et al, 2002). A capacidade funcional da cartilagem articular depende fortemente das proteoglicanas, sendo que sua depleção compromete as propriedades biomecânicas. Foi estabelecido um coeficiente de correlação significativo entre a rigidez compressiva e a concentração da GAGs. Quanto maior a concentração, mais rígida é a cartilagem (Angel et al, 2003).

Alguns autores relatam não haver alterações no conteúdo do colágeno (Haapala et al, 1999; Arokoski et al, 2000). Apenas a diminuição da quantidade do colágeno *crosslink* (Haapala et al, 1999; Narmoreva et al, 2002).

Também são esperadas alterações na matriz da cartilagem de membros contralaterais aos imobilizados, uma vez que, esse membro passa a sofrer uma maior descarga de peso e alteração no padrão da marcha. Entretanto foram encontradas diferentes respostas em diferentes modelos animais. Por exemplo, aumento do conteúdo de glicosaminoglicana após o aumento da descarga de peso em articulações de caninos e ovinos, enquanto manutenção ou até diminuição dos mesmos em coelhos (Jortikka et al, 1997).

3.5 Respostas da Cartilagem Resultantes da Remobilização Articular.

Após a retirada de imobilização as formas dos movimentos podem variar como, por exemplo, remobilização, exercício físico e alongamentos. (Mattiello-Rosa, 1999). Existem alguns estudos realizados após protocolos de imobilização que investigam a resposta dessa cartilagem a remobilização. Nesses experimentos o termo remobilização significa deixar o animal livre na gaiola (Säämänen et al, 1990; Kiviranta et al, 1994; Jortikka et al, 1997; Haapala et al, 1999; Haapala et al, 2001; Vanwanseele et al, 2002).

A proporção de ligações cruzadas de colágeno e a diminuição da espessura na camada calcificada, no mesmo estudo, retornaram aos níveis comparáveis ao grupo controle (Haapala et al, 1999). Entretanto, no estudo de Kiviranta et al (1994) não houve aumento da espessura em algumas áreas, principalmente as de menor compressão após remobilização.

Com relação às proteoglicanas, Jortikka et al (1997) relatam em seu estudo que mesmo após 50 semanas de remobilização, precedidas de 11 semanas de imobilização, a concentração de proteoglicanas, que havia reduzido, permaneceu 14-28% abaixo dos controles em algumas regiões estudadas. Já no membro contralateral, houve um aumento de 49% na concentração em alguns locais e uma diminuição de 34% em outros. Ou seja, a depleção de proteoglicanas não foi completamente restabelecida em algumas regiões após remobilização. Haapala et al (1999), também após remobilização de 50 semanas, observaram recuperação da concentração de glicosaminoglicana na maioria das regiões, porém, não em todas. As propriedades biomecânicas da cartilagem dependem fortemente das proteoglicanas. Sua depleção tem relação direta com o amaciamento do tecido que poderá sofrer alterações permanentes quando submetido a descargas de peso mais forçadas após imobilização (Säämänen et al, 1990).

Sabe-se que a percepção do meio mecânico pelo condrócito se dá pela interação biológica e biofísica entre o mesmo e sua matriz extracelular (Guilak et al, 1999). Forças mecânicas têm grande influência na síntese e taxa de turnover de moléculas da cartilagem articular como as proteoglicanas. Estudos relatam que a carga cíclica regular da articulação aumenta a síntese de proteoglicanas e mantém a rigidez da cartilagem. Por outro lado a compressão contínua diminui essa síntese e causa lesão do tecido através de necrose (Arokoski et al, 2000). Hall et al (1991) obtiveram resultados positivos de síntese de proteoglicanas ao realizarem compressões estáticas com magnitudes, consideradas fisiológicas, de 5 e 10 MPa por 20s e também por 2hs em fragmentos de cartilagem bovina. Quando essa compressão aumentou para 20MPa a biossíntese foi significativamente suprimida na exposição de 2hs, mas não na de 20s. Ikenoue et al (2003) através de pressão hidrostática intermitente em culturas de condrócitos obteve respostas positivas conforme o período de aplicação do protocolo. Observou aumento de sinal para síntese de agrecano com compressões de 1Hz após 4hs

com compressões de 5 e 10 MPa, no primeiro dia. Já o sinal para síntese de colágeno só ocorreu, com as mesmas cargas, frequência e duração, no quarto dia de compressão.

Durante protocolos de alongamento muscular são realizadas forças compressivas estáticas com diferentes durações e magnitudes de compressão. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos que associassem a duração e a magnitude dessa compressão com a resposta da cartilagem articular previamente imobilizada.

3.6 Modelos de avaliação do dano à cartilagem articular.

Segundo Ostergaard et al (1999) a histopatologia da OA é geralmente graduada através do Sistema de Graduação Histológico-Histoquímico para cartilagem articular osteoartrítica (SGHH) proposto por Mankin et al (1971), ou outros sistemas de graduação histopatológicos modificados deste. Recentemente, esse sistema e suas modificações têm sido extensivamente utilizados também em modelos animais. Entretanto, após investigar a reprodutibilidade intra e interobservador os mesmos autores afirmam que ainda não existe um sistema “Padrão Ouro” para avaliação histológica da cartilagem articular.

A tabela de Mankin et al, 1971 (ANEXO IV) avaliam e gradua os itens estrutura, célula, coloração por safranina e integridade da linha de crescimento. Em sua tabela a presença de clones está inserida no item “célula”, representando um terceiro estágio de evolução da doença. A literatura mostra que na progressão da lesão da cartilagem articular ocorrem a perda das proteoglicanas da matriz e a ruptura da rede fibrilar colagenosa (Hunziker, 2002), seguida pela migração dos condrócitos (Angel et al, 2003), proliferação celular, degradação do tecido (Felice et al, 2002) e, em último estágio, morte celular (Hunziker, 2002). Portanto, no item celularidade da tabela de Mankin et al (1971) podemos observar a representação da evolução da osteoartrite com relação ao comportamento celular: normal, hiper celularidade difusa, clones e hipocelularidade.

Entretanto, nem todas as variáveis apresentadas por Mankin são avaliadas em estudos sobre as conseqüências da imobilização. Segundo LeRoux et al (2001) análises

histológicas têm sido realizadas sem o uso de um sistema de graduação compreensível para modelos de imobilização. Em um estudo sobre alteração mecânica e histomorfométrica após imobilização articular, esses autores, elaboraram um esquema de graduação aplicável a essa situação (ANEXO V). No sistema descrito por esses autores novamente são observadas as variáveis clone e ortocromasia para proteoglicana. Entretanto, nesse sistema a presença de clones é mais detalhadamente descrita. LeRoux et al (2001) apresentaram um item chamado clone de condrócitos que classificaram da seguinte forma: ausência, pares ocasionais, pares densos e aglomerados de clones. Essa forma de análise valoriza a resposta dos condrócitos frente aos modelos de imobilização. Além da avaliação de clones, os autores propõem a observação de fibrilação e fendas da cartilagem articular, além de microrupturas da cartilagem calcificada e osso subcondral.

Assim, em estudos da cartilagem articular parece necessário não haver separação entre modelos de imobilização e osteoartrite, considerando que o tecido poderá responder ou sofrer adaptações características dos dois tipos de agressão.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 22 ratos albinos adultos jovens ($280 \pm 25,4$ g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, e mantidos em biotério próprio do Laboratório de Neurociências, Departamento de Fisioterapia.

Os animais 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.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: imobilizado (I), n=6, imobilizado e alongado (IA), n=5, alongado (A), n=6 e controle (C), n=5.. Os procedimentos foram realizados conforme Tabela 1. Todos os animais foram avaliados sete semanas após o início do experimento.

Tabela 1: Esquema dos grupos experimentais com os procedimentos correspondentes.

GRUPOS	4 SEMANAS	3 SEMANAS	Ao fim da sétima semana
I (n=6)	Imobilizados	Livres na gaiola	Eutanasiados
IA (n=5)	Imobilizados	Alongados	Eutanasiados
A (n=6)	Livres na gaiola	Alongados	Eutanasiados
C (n=5)	Livres na gaiola	Livres na gaiola	Eutanasiados

4.3 Pesagem dos animais

Todos os animais foram pesados em uma balança analítica tanto no período inicial do experimento como no dia da eutanásia. Os dados referentes à variação de peso entre os grupos experimentais foram avaliados por meio de análise descritiva.

4.4 Protocolo de Imobilização

Os animais dos grupos I e IA 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 de imobilização, conforme Figura 1. A articulação direita permaneceu livre. Nestes grupos, a imobilização foi mantida por quatro semanas consecutivas. Após esse período imobilização foi retirada dos dois grupos. Os animais do grupo I permaneceram livres na gaiola por mais quatro semanas e os do grupo IA foram submetidos ao protocolo de alongamento muscular citado a seguir, por três semanas.

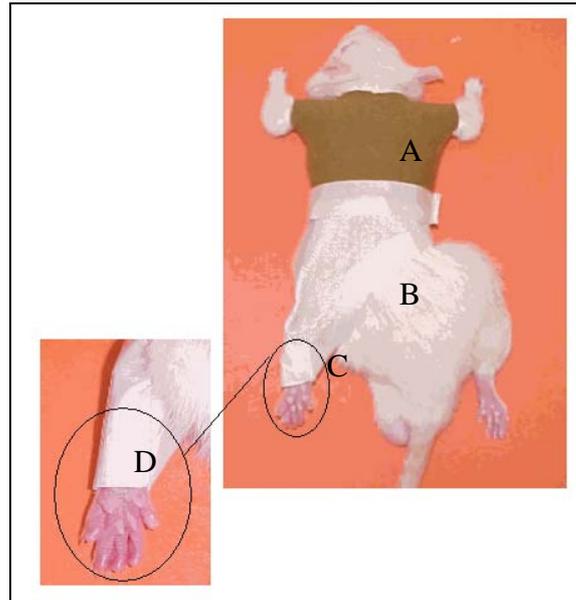


Figura 2: Modelo de Imobilização utilizado. A: Parte superior de algodão, similar a uma camiseta; B: parte inferior feita com uma malha de aço com as bordas protegidas com fita adesiva; C: flexão plantar realizada com fita adesiva e finalizada com a malha de aço; D: forma final da imobilização do tornozelo. FONTE: Coutinho, EL; Gomes ANS; França C; Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. Braz. J. Med. Biol Res. (2002) 35: 1329 -1332.

4.5 Técnica de Alongamento Muscular Passivo Intermitente

Os animais do grupo IA e A 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, conforme Figura 4, manualmente, por períodos de 60s intercalados com 30s de relaxamento com dez repetições, por sete dias na semana, durante três semanas.



Figura 3: Foto do procedimento de alongamento muscular.

4.6 Retirada das articulações do tornozelo

Após o sacrifício dos animais, os tornozelos esquerdos e direitos foram removidos, as peles retiradas e as peças fixadas em formol a 10% até seu processamento histológico.

4.7 Preparo das peças para Análise Histológica

Os tornozelos foram submetidos à descalcificação em Ácido Nítrico à 7,5% acrescido de glicerina na mesma concentração durante, aproximadamente, 7 dias (95 horas). Posteriormente, em cada peça foi realizado um corte sagital perpendicular à superfície articular da articulação talocrural dividindo cada tornozelo em duas partes, uma medial e uma lateral, representado na Figura 3.



Figura 4: Desenho esquemático dos cortes realizados na articulação talo crural. A: Linha divisória entre as regiões medial e lateral, vista posterior.

Esse material foi processado em parafina (ANEXO I) e emblocado. Obteve-se um bloco para cada metade de tornozelo. De cada bloco foram obtidos três cortes seriados de 6 μ m de espessura com intervalo de 50 μ m entre cada corte. Foi utilizado Micrótomo Leica RM2145. Foram obtidos, então, um total de 6 cortes por tornozelo (3 mediais e 3 laterais) para cada coloração utilizada. Essa forma de corte permitiu a análise de diferentes regiões da cartilagem articular. Para a análise histológica e histoquímica da cartilagem articular, as lâminas foram coradas respectivamente por Hematoxilina-Eosina e por coloração especial – Safranina-O fast green (ANEXO II).

4.8 Procedimento de avaliação dos cortes histológicos

Todas as lâminas foram avaliadas através de microscopia de luz (Axiolab Zeiss) por dois observadores, sempre os mesmos. Essas avaliações foram cegas. Previamente à avaliação foi realizado um estudo piloto para observação da estrutura da cartilagem articular do tornozelo de ratos normais e para treinamento dos observadores com relação aos parâmetros a serem avaliados.

Os cortes histológicos dos tornozelos dos ratos normais deste estudo piloto foram utilizados como parâmetro de normalidade para comparação com todos os grupos do experimento ao longo das avaliações. O tecido foi avaliado ao longo de toda sua extensão, partindo de um menor aumento (5X) até a avaliação campo por campo, ainda de toda extensão, com aumento de 40X.

Para graduação histológica e histoquímica do efeito do protocolo de alongamento muscular, utilizado no presente estudo, foi elaborada uma tabela de pontuação com nível crescente de lesão a partir da adaptação de dois sistemas de graduação para o dano a esse tecido. São eles: Sistema de Graduação Histológico-Histoquímico para Cartilagem Articular Osteoartrítica, Mankin et al, 1971 (ANEXO IV) e o sistema elaborado e utilizado por LeRoux et al, 2001 (ANEXO V) de classificação de danos histomorfométricos na cartilagem articular após imobilização. Na tabela elaborada foram consideradas as seguintes variáveis: a) celularidade, b) presença de clones, c) ortocromasia para Safranina-O, conforme ilustrado na tabela 2.

A variável celularidade foi avaliada qualitativamente a partir dos cortes corados com H&E e graduada conforme a tabela utilizada (Tabela 2) a partir da comparação com as lâminas normais obtidas no estudo piloto. Os cortes histológicos foram avaliados campo a campo com aumento de 40x. Foi considerado hiper celularidade o corte histológico que continha dois campos com a celularidade aumentada e a partir de três campos foi considerada hiper celularidade difusa. Nesse item, a graduação da tabela segue a seqüência dos eventos descritos que ocorrem com a celularidade após o dano à cartilagem articular. Após lesão ocorre uma migração parcial dos condrócitos através da matriz extracelular, seguida por proliferação celular e posterior morte celular (Angel et al, 2003; Clements et al, 2004). Representados pela seguinte seqüência: normal, hiper celularidade, hiper celularidade difusa, e hipocelularidade.

Clone foi definido como a presença de mais de um condrócito dentro de uma mesma lacuna na zona superficial da cartilagem (LeRoux, 2001). A análise dessa variável também foi realizada a partir das lâminas coradas com H&E. Foi considerada como ausência, graduação zero, a presença de até três clones ao longo do tecido. Não foram encontrados dados na literatura referentes a presença de clones na cartilagem articular normal, entretanto os mesmos foram encontrados em pequena quantidade nos tecidos normais do estudo piloto. A existência de quatro até seis foi considerada como pares ocasionais e acima de sete, muitos pares.

No item ortocromasia para Safranina-O foi avaliado o conteúdo de proteoglicanas. A correlação entre essa coloração e o conteúdo dessa molécula tem sido bem documentada (Haapala, 1999). A Safranina-O é uma coloração catiônica que se

liga aos poliânions das GAGs (Kiviranta, 1994). Portanto, maior intensidade do corante, maior conteúdo de proteoglicana. Foi avaliada toda a extensão do tecido, campo a campo com aumento de 40X. Reduções leves em até metade da área total foram consideradas grau 1, quando essa redução foi além de metade da extensão total ou por toda superfície recebeu graduação 2. Quando a redução apresentou-se intensa foi graduada como 3 para metade da extensão e 4 quando em toda extensão do tecido.

Tabela 2: Critérios de avaliação dos níveis de lesão da cartilagem articular, a partir dos Sistemas de Graduação Histológico-Histoquímico para cartilagem articular de Mankin et al (1971) e LeRoux et al (2001) modificados.

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
III COLORAÇÃO POR SAFRANINA	
Normal	0
Redução leve em até metade da área total	1
Redução leve na extensão total	2
Redução intensa em até metade da área ou superfície	3
Redução intensa em toda extensão	4

5. Análise Estatística

Para avaliar a correlação entre os resultados obtidos pelos dois observadores foi utilizado o teste de Spearman com $R \geq 0,8$ e $p \leq 0,05$. A comparação entre o peso antes e após o experimento foi realizada através do teste T de Student. Para comparação entre os tornozelos esquerdos, bem como, os direitos dos diferentes grupos foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com Post Hoc Newman Keuls ($p \leq 0,05$). Para comparações entre o tornozelo direito e o esquerdo do mesmo grupo, além da investigação entre as regiões lateral e medial dos mesmos foi utilizado o teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

6. Resultados

6.1 Pesos dos Animais

Os animais apresentaram média de peso inicial de $280 \pm 25,4\text{g}$. Ao final do experimento seu peso final médio foi de $347 \pm 51,1\text{g}$. As médias, desvios padrão e variação dos pesos ao início e final do experimento estão ilustradas na Tabela 3. Todos os grupos apresentaram aumento médio de peso ao final do experimento. Entretanto, apenas nos grupos A e C esse ganho apresentou significância estatística.

Tabela 3: Pesos dos animais (g) no início e no final do experimento.

Ratos	Grupo I		Grupo IA		Grupo A		Grupo C	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	240	325	340	324	281	316	316	460
2	329	370	292	351	245	314	324	399
3	249	341	269	319	249	319	290	438
4	268	227	257	300	272	362	310	401
5	275	337	282	305	283	365	303	408
6	307	335	-	-	256	335	-	-
Média	278	322,5	288	319,8	264,33	335,16*	308,6	421,2*
DP	34,16	49,17	31,92	20,01	16,51	23,18	12,95	26,75

*aumento de peso significativo ao final do experimento quando comparado com o peso inicial (intragrupo). Grupo A $p=0,000$, grupo C $p=0,001$. Nível de significância 0,05.

6.2 Correlação entre os achados dos dois observadores

Todas as análises histológicas e histoquímicas do presente estudo apresentaram correlação interobservadores ($r > 0,8$ e $p \leq 0,05$).

6.3 Clones

As médias e desvios padrão das classificações quanto à presença de clones das patas tratadas e contralaterais estão representados na Figura 5.

No grupo IA, predominantemente na pata contralateral, foram encontrados densos pares de clones, em algumas lâminas analisadas (classificação 2), ilustrado na Figura 6A. No grupo A e C predominou a ausência de clones (classificação 0), conforme Figura 6B, em ambas patas. Já o grupo I apresentou moderada quantidade de pares ocasionais (classificação 1), ilustrado na figura 6A.

Na comparação entre a pata contralateral intergrupos, o grupo IA apresentou significativamente a maior quantidade de clones, (I e IA, $p=0,014$; IA e A, $p=0,000$; IA e C, $p=0,000$).

Na pata tratada houve diferença significativa entre os grupos IA e A ($p=0,033$). O grupo A apresentou ausência de clones enquanto o grupo IA apresentou pares de clones ocasionais. Não houve diferença entre o grupo A e o grupo C com relação a essa variável.

Quando comparadas as patas contralateral e tratada intragrupo foi observado que apenas o grupo IA apresentou diferença estatística entre as patas ($p= 0,038$). As patas contralaterais deste grupo apresentaram significativamente maiores graduações para essa variável do que as patas tratadas.

Na comparação entre as regiões medial e lateral nenhum grupo apresentou diferença estatística significativa entre as regiões com relação à presença de clones

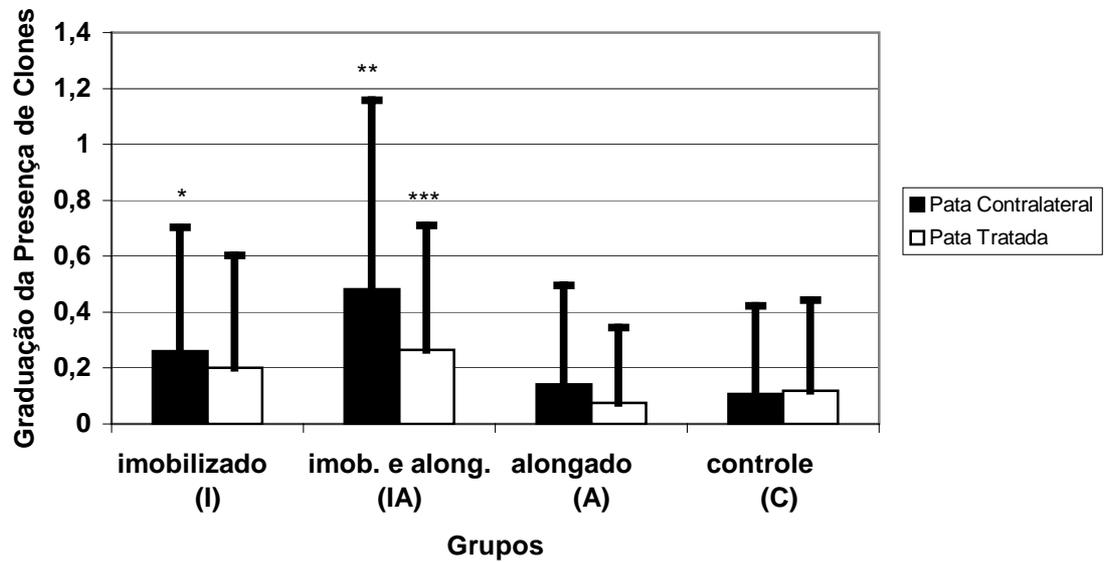


Figura 5: Representação das médias e desvios padrão relativas à presença de clones observadas nos diferentes grupos (patas contralaterais e tratadas); conforme graduação na Tabela 2. Diferenças estatísticas relativas às comparações intergrupos. *diferença significativa entre os grupos I e IA, ($p=0,014$), na pata contralateral. **diferença estatística entre o grupo IA e o grupo I, A ($p=0,000$) e C ($p=0,000$), patas contralaterais. *** diferença estatística entre os grupos IA e A, ($p=0,033$), na comparação das patas tratadas.

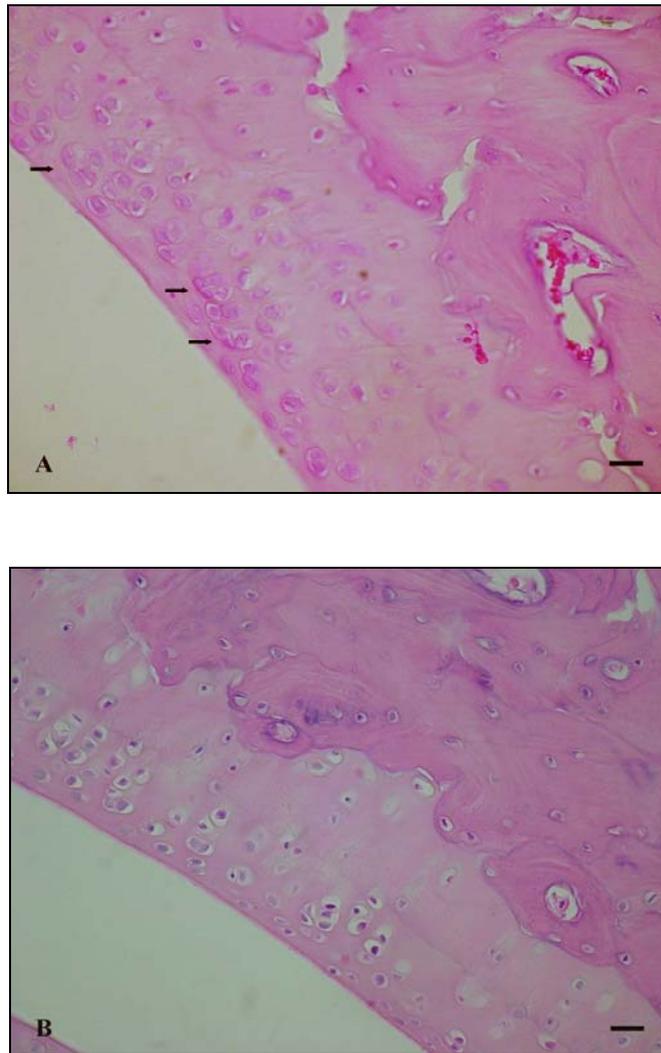


Figura 6: Fotomicrografia da cartilagem articular, coloração H&E; A: Presença de pares de clones (seta), classificação grau 1; corte histológico de um animal do grupo I, pata contralateral; B: Cartilagem normal com relação a presença de clones, classificação grau 0 na tabela utilizada; animal do grupo C, pata contralateral. Barra = 21 μ m.

6.4 Celularidade

Quando comparada a celularidade entre os diferentes grupos foi observado que apenas o grupo controle apresentou celularidade significativamente normal. Esse resultado ocorreu tanto na pata contralateral (C e I, $p=0,000$; C e IA, $p=0,000$; C e A, $p=0,000$), como na tratada (grupos C e I, $p=0,015$; C e IA, $p=0,005$; C e A, $p=0,024$), conforme ilustrado na Figura 7.

Nos grupos I e IA foram encontrados raros cortes histológicos apresentando hipocelularidade (grau 3) conforme ilustrado na Figura 8D, nesses grupos houve predomínio de hiper celularidade (grau 1), mas também foi encontrada hiper celularidade difusa em outras lâminas. No grupo A foram observados cortes com celularidade normal (Figura 8A) e outros com presença de hiper celularidade (grau 1), conforme Figura 8B. O grupo C apresentou-se normal (grau 0) para celularidade, Figura 8A.

Na comparação entre as patas contralaterais com as tratadas, intragrupo, apenas o grupo IA apresentou diferença ($p=0,038$). Nesse grupo a pata contralateral apresentou maior alteração de celularidade.

Na comparação entre as regiões medial e lateral intragrupo, o grupo I apresentou diferença entre as regiões. A região lateral da pata contralateral apresentou maior alteração de celularidade que a região medial ($p=0,022$). O grupo IA também apresentou diferença entre as regiões na pata contralateral ($p=0,022$). Entretanto, nesse grupo, diferentemente do grupo I a região com maior alteração foi a medial.

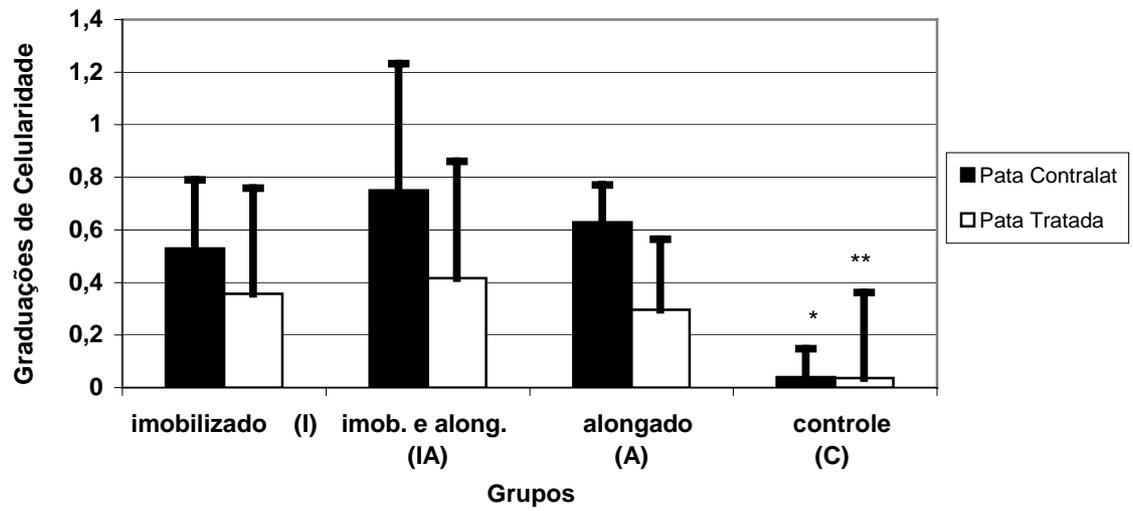


Figura 7: Representação das médias e desvios padrão das alterações na celularidade observadas nos diferentes grupos (patas contralaterais e tratadas). Conforme classificação na Tabela 2. Diferenças estatísticas relativas às comparações intergrupos.
 * diferença significativa entre os grupos C e I ($p=0,000$), C e IA ($p=0,000$), C e A ($p=0,000$).
 ** diferença estatística entre os grupos C e I ($p=0,015$), C e IA ($p=0,005$), C e A ($p=0,024$).

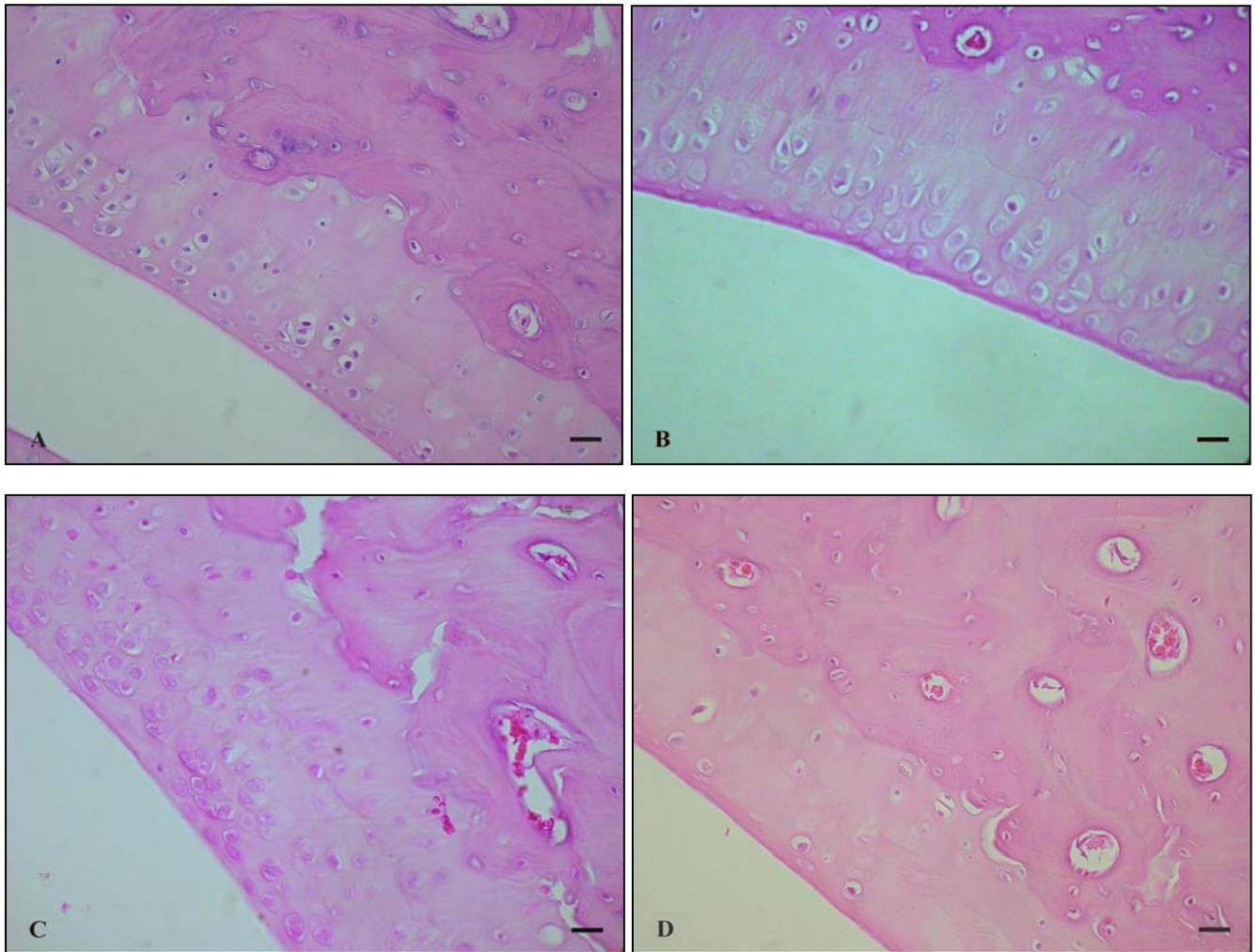


Figura 8: Fotomicrografia da cartilagem articular de rato, coloração H&E. A: celularidade normal, classificação 0 na tabela, animal do grupo C; B: hiper celularidade, classificação grau 1, pata contralateral do animal do grupo I; C: hiper celularidade difusa, grau 2 pata contralateral de um animal do grupo I; D: Hipocelularidade, classificação grau 3 na tabela, pata contralateral de um animal do grupo I. Barra = 21 μ m.

6.5 Safranina

Na comparação entre as patas contralaterais intergrupos, os grupos I e IA apresentaram diferença com relação a todos, inclusive entre eles (grupos I e IA, $p=0,004$; I e A, $p=0,000$; I e C, $p=0,000$; IA e A, $p=0,00$; IA e C, $p=0,000$). Já os grupos A e C mantiveram-se iguais para coloração de Safranina-O. O grupo IA apresentou maior perda dessa coloração quando comparado com todos, ilustrado na Figura 9.

Na pata tratada foram observados os mesmos resultados, diferença dos grupos I e IA com relação a todos os outros (I e IA, $p=0,002$; I e A, $p=0,000$; I e C, $p=0,000$; IA e A, $p=0,000$; IA e C $p=0,000$). Novamente, o grupo IA foi o que obteve a maior perda dessa coloração. Os grupos C e A não apresentaram diferença entre si, ilustrado na Figura 9.

Na avaliação da tabela 2 foram encontradas lâminas com intensidade normal e também com reduções intensas da coloração na área total (classificação do 0 ao 4) tanto no grupo I como no grupo IA. Entretanto, a quantidade de reduções intensas (grau 4), ilustrado na Figura 10D, foi rara para ambos. As perdas de intensidade de coloração, nesses grupos, ocorreram predominantemente nas regiões superficiais (Figura 10C). O grupo C apresentou raras reduções leves em até metade da área total (grau 1), conforme Figura 10B. Predominou intensidade normal para a coloração nesse grupo (Figura 10A). Já o grupo controle apresentou intensidade normal de coloração para Safranina-O (Figura 10A).

Na comparação entre as patas contralaterais e tratadas intragrupos nenhum apresentou diferença de intensidade do corante entre as patas.

Quando comparadas as regiões medial e lateral intragrupos foram encontradas diferenças entre as mesmas na pata tratada do grupo I e IA. No grupo I a região lateral apresentou maior perda de intensidade da coloração ($p=0,000$). Já no grupo IA a região lateral também foi a que apresentou maior perda de intensidade de Safranina-O ($p=0,017$).

O grupo IA também apresentou diferença na pata contralateral ($p=0,001$). Nessa pata a região com maior perda de intensidade do corante foi a medial.

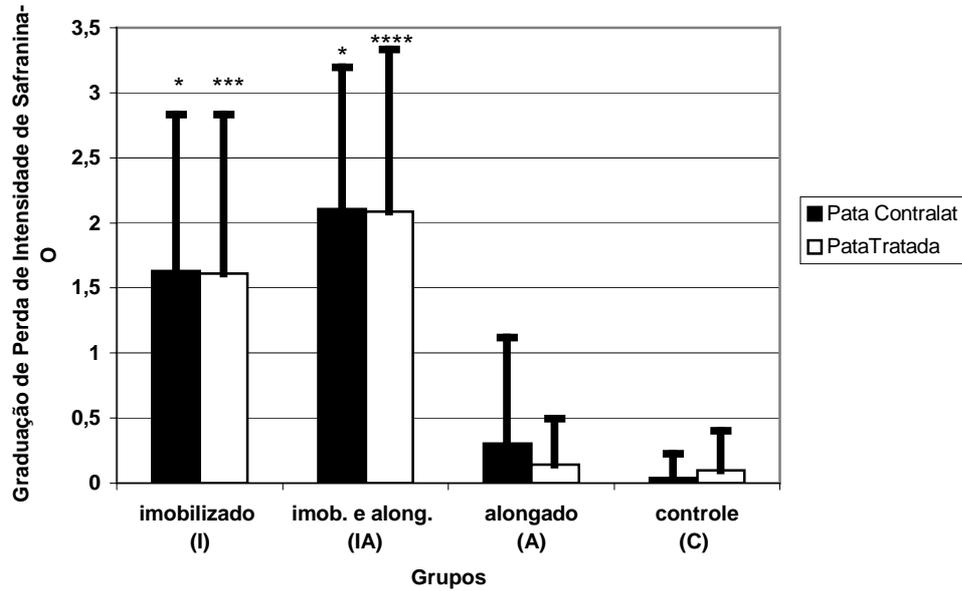


Figura 9: Representação das médias e desvios padrão das perdas de intensidade de Safranina-O observadas nos diferentes grupos (patas contralaterais e tratadas). Comparações entre os diferentes grupos: *diferença significativa entre os grupos I e IA ($p=0,004$), I e A ($p=0,000$), I e C ($p=0,000$). **diferença estatística entre os grupos IA e A ($p=0,00$), IA e C ($p=0,000$). ***diferença significativa entre os grupos I e IA ($p=0,002$), I e A ($p=0,000$), I e C ($p=0,000$). ****diferença significativa entre os grupos IA e A ($p=0,000$), IA e C ($p=0,000$).

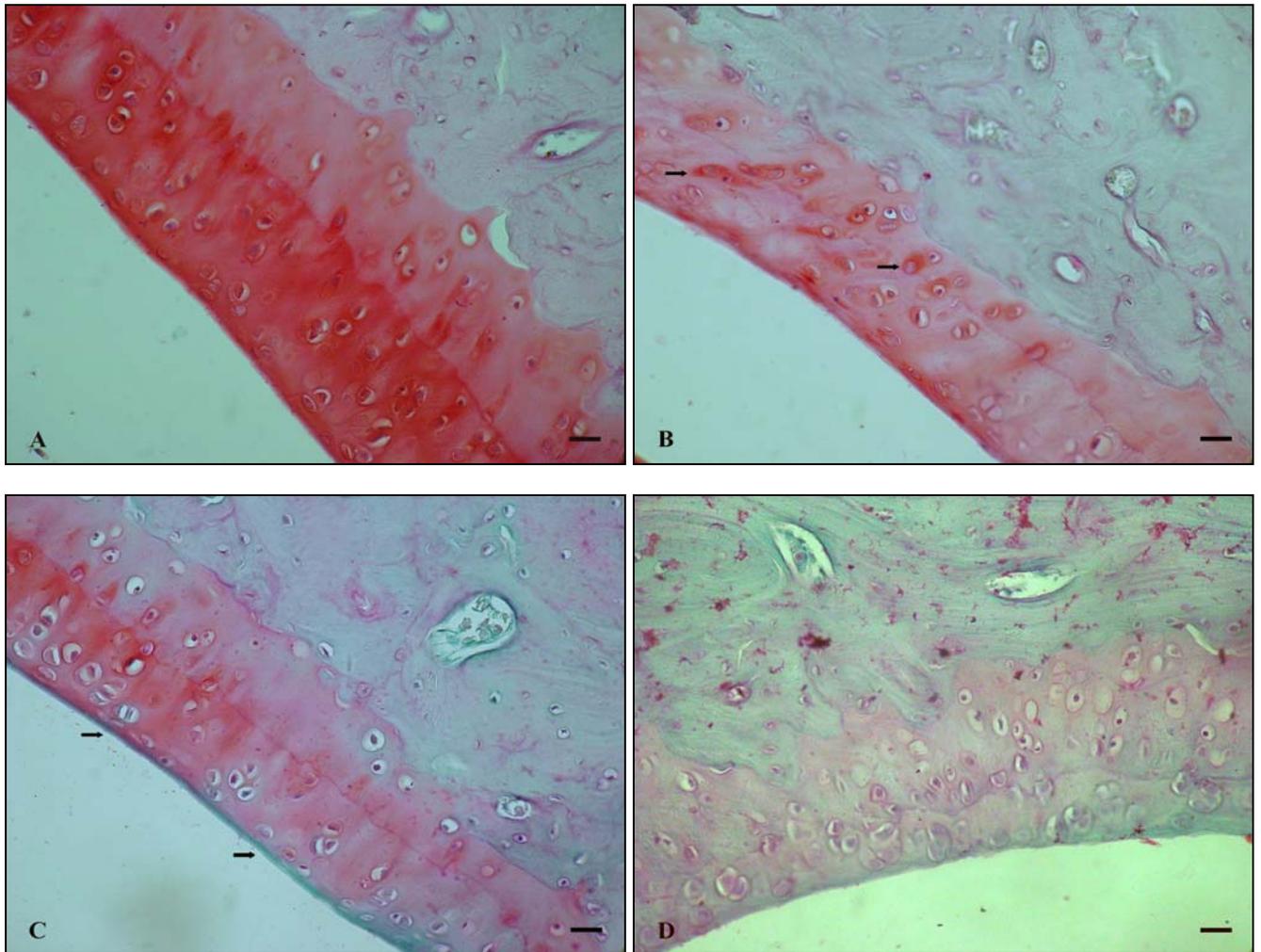


Figura 10: Fotomicrografia da cartilagem articular de rato, ortocromasia para Safranina-O fast green. A: cartilagem articular normal, intensa coloração para Safranina, classificação grau 0 na tabela, pata tratada de um animal do grupo C; B: perda leve da intensidade; grau 1 quando em até metade da extensão e grau 2 quando por toda a área da cartilagem articular; áreas de intensa coloração pela safranina ao redor dos condrócitos indicando maior conteúdo de proteoglicanas na região (seta), ilustração de pata tratada de um animal do grupo I; C: Perda intensa da coloração para Safranina, em uma região da cartilagem ou por toda superfície (seta), indicando perda importante de proteoglicanas na região indicando classificação grau 3; ilustração da pata contralateral de um animal do grupo I; D: perda intensa da coloração em toda extensão da cartilagem articular, grau 4, pata tratada de um animal do grupo IA. Barra = 21 μ m.

7. Discussão

No presente estudo, o grupo submetido ao protocolo de alongamento muscular que foi previamente imobilizado apresentou importantes alterações teciduais, tanto nos membros experimentais como nos contralaterais. A resposta da cartilagem articular submetida a imobilização/alongamento e a contralateral/sobrecarregada foi claramente diferente com relação aos parâmetros avaliados no presente estudo. A comparação entre as patas direita e esquerda demonstrou diferença entre as duas com relação à gradação de celularidade e presença de clones. As patas traseiras contralaterais apresentaram hiper celularidade e pares de clones ocasionais enquanto que as patas tratadas apresentaram menores alterações. Entretanto ambas apresentaram perda significativa do conteúdo de proteoglicanas. É importante lembrar que alterações de celularidade, como presença de clones e perda de coloração por safranina-O estão relacionadas a respostas degenerativas (Mankin et al, 1971). Portanto, os resultados do presente estudo indicam uma resposta tecidual degenerativa leve do membro contralateral no grupo IA. Esses achados no membro contralateral já foram observados em outros estudos e parecem justificadas pela alteração no padrão de marcha e pela sobrecarga imposta a esse membro quando o oposto está submetido a imobilização (Jortikka et al, 1997). Entretanto, o mesmo autor, após revisão de literatura, encontrou diferentes respostas a sobrecarga de acordo com o modelo animal estudado. O conteúdo de glicosaminoglicana aumentou após sobrecarga nas articulações de caninos e ovinos, enquanto que em coelhos permaneceu igual ou diminuiu. Segundo Andriacchi et al (2004) o início de alterações degenerativas não ocorre apenas por pressões de contato aumentadas, mas sim associada a alterações na cinemática articular. A alteração das regiões de carga para regiões não usualmente sobrecarregadas gerou dano mecânico na cartilagem em seu estudo.

Foi descrito na literatura que a imobilização causava degeneração da cartilagem articular (Walker, 1998). Hoje, alguns autores adotam a palavra atrofia para denominar o que ocorre esse tecido após utilização desse recurso (Haapala et al, 1999). O que alegam é que a imobilização gera quiescência do tecido. Não existe um consenso com relação aos termos nem com relação às respostas da cartilagem. Na verdade, existe uma ampla variação de respostas quando se estuda diferentes articulações, regiões da articulação, modelos de imobilização e diferentes modelos animais (Jortikka et al, 1997). No presente estudo não houve alteração da celularidade nem presença de clones na pata imobilizada do grupo que foi somente imobilizado (I). Nesse membro houve alteração apenas da intensidade de coloração por Safranina-O, o que concorda com os achados da literatura (Carter et al, 2004; LeRoux et al, 2001).

A resposta da cartilagem articular ao alongamento muscular após imobilização foi diferente da contralateral, uma vez que apresentou aumento leve da celularidade, significativamente inferior ao contralateral e não apresentou clone de condrócito quando comparado ao grupo controle. De fato, apenas a ortocromasia para Safranina-O apresentou redução significativa quando comparada aos outros grupos. A correlação entre a intensidade da coloração de Safranina-O e o conteúdo de proteoglicana da cartilagem articular tem sido documentado (Haapala, 1999). Estudos prévios usaram Safranina-O, um corante catiônico que se liga aos poliânions das GAGs (Kiviranta, 1994), para avaliar o conteúdo de proteoglicana da cartilagem articular (Okasaki et al, 1996; Haapala et al, 1999, Narmoreva et al, 2002). A diminuição da concentração dessa molécula é uma das primeiras anormalidades detectáveis após imobilização (Narmoreva, 2002). No presente estudo, o grupo imobilizado apresentou diminuição na coloração de Safranina-O, entretanto essa perda foi significativamente maior no grupo submetido ao alongamento após imobilização. O grupo IA apresentou leve redução em toda extensão enquanto o grupo I apresentou leve redução em até metade da extensão e o grupo A estava normal, não apresentando diferença do grupo normal. A capacidade funcional da cartilagem articular depende fortemente das proteoglicanas, sendo que sua depleção compromete as propriedades biomecânicas. Foi estabelecido um coeficiente de correlação significativo entre a rigidez compressiva e a concentração da GAGs. Quanto maior a concentração, mais rígida é a cartilagem (Angel et al, 2003). Portanto, essa

maior perda de proteoglicanas sofrida pelo grupo submetido ao alongamento após imobilização pode levar ao comprometimento biomecânico do tecido.

Possíveis explicações para esses resultados foram encontrados em estudos de aplicação de cargas compressivas realizados por Ikenoue et al (2003), Palmoski e Brant (1984) e Hall et al (1991). Ikenoue et al (2003) aplicaram pressão hidrostática intermitente (PHI) em culturas de condrócitos. Os resultados demonstraram que PHI aumentou níveis protéicos e a sinalização do mRNA para agregano e colágeno tipo II de acordo com a duração e magnitude do estímulo de aplicação do estímulo. Observaram aumento de sinal para síntese de agregano com compressões de 1Hz após 4hs com compressões de 5 e 10 MPa, no primeiro dia. Já o sinal para síntese de colágeno só ocorreu, com as mesmas cargas, frequência e duração, no quarto dia de compressão. Concluíram que mecanoregulação da matriz extracelular da cartilagem articular *in vivo* depende dos parâmetros específicos da carga das articulações diartrodiais. O efeito desse estímulo depende dos mesmos serem aplicados a níveis fisiológicos ou em níveis que excedam os limites normais. Palmoski e Brant (1984) submeteram plugs de cartilagem a estresses estáticos e cíclicos equivalentes a 1,5 o peso do corpo. Eles observaram resposta positiva, um aumento de 38% na síntese de GAG com ciclo de 4s on/11s off e uma resposta negativa, diminuição na síntese com ciclo de 60s on/60s off. Hall et al (1991) obtiveram resultados positivos de síntese de proteoglicanas ao realizarem compressões estáticas com magnitudes, consideradas fisiológicas, de 5 e 10 MPa por 20s e também por 2hs em fragmentos de cartilagem bovina. Quando essa compressão aumentou para 20MPa a biossíntese foi significativamente suprimida na exposição de 2hs, mas não na de 20s.

Por outro lado, o grupo somente alongado não apresentou diferença com relação a celularidade, presença de clones e coloração por safranina-O quando comparado ao grupo controle. Suas médias de graduação da tabela aplicada permaneceram baixas, indicando ausência de dano ou resposta tecidual. Esses dados sugerem que o mesmo protocolo de alongamento aplicado não prejudicou a cartilagem sadia.

Esses estudos indicam que a resposta da cartilagem articular a carga depende basicamente da duração e magnitude dessa compressão. No presente estudo apenas a duração do alongamento foi controlada e essa duração isoladamente não gerou danos na

cartilagem apenas alongada do grupo A. A perda da amplitude de movimento por rigidez articular é um achado comum após período de imobilização. É possível que no grupo previamente imobilizado (IA) tenha sido necessária uma maior carga compressiva para que fosse obtida flexão dorsal máxima durante o protocolo quando comparado ao grupo apenas alongado (A). Outro aspecto importante é a alteração tecidual decorrente da própria imobilização que associada à compressão estática influenciou nesse resultado.

Transpondo esses dados para a prática clínica parece importante controlar a magnitude e duração da carga compressiva. De fato, durante protocolos de alongamento muscular são aplicadas cargas compressivas que além de estáticas não têm sua magnitude controlada. No presente estudo a magnitude da carga parece ter sido o fator mais decisivo para a perda tecidual, entretanto estudos sugerem um efeito mais benéfico para a cartilagem durante compressões cíclicas, com baixas frequências. Mais estudos são necessários para que se descubra a magnitude fisiológica de compressão da cartilagem articular e se essa magnitude altera no tecido previamente imobilizado uma vez que existe alteração de sua matriz extracelular.

8. Conclusão

O protocolo de alongamento muscular aplicado nesse estudo foi prejudicial para a cartilagem articular previamente imobilizada.

O mesmo protocolo de alongamento muscular não provocou alterações teciduais quando realizado nos animais previamente livres na gaiola.

A sobrecarga imposta no membro contralateral ao imobilizado provocou alterações degenerativas leves com relação a celularidade, presença de clones e diminuição de proteoglicanas nessas patas.

A imobilização provocou diminuição da concentração de proteoglicanas nas patas imobilizadas.

A cartilagem articular respondeu à imobilização e à sobrecarga e compressão cíclica de forma diferente. A imobilização gerou alteração apenas na concentração da proteoglicanas da pata imobilizada. Enquanto alterações de celularidade, presença de clones e concentração de proteoglicanas foram encontradas somente nos membros contralaterais às patas imobilizadas.

Referências Bibliográficas

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALTER MJ. **Ciência da Flexibilidade**. 2ª ed, Porto Alegre: Artmed, 1999.

ANDREACCHI TP, MUNDERMANN A, SMITH RL, et al. A framework for understanding the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. **Ann Biomed Eng** 2004; 32:457-77.

ANGEL J, RAZZANO P, GRANDE D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage repairs and response to injury. **Sports Med Arthrosc Rev** 2003; 11(3): 168-81.

AROKOSKI JPA, JURVELIN JS, VÄÄTÄINEN U, HELMINEN HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scand J Med Sci Sports** 2000; 10: 186-98.

BEHRENS F, KRAFT EL, OEGEMA TR JR. Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. **J. Orthop. Res** 1989; 7(3): 335-43.

CARTER DR, BEAUPRÉ GS, WONG M, SMITH L, ANDRIACCHI TP, SCHURMAN DJ. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. **Clin Orthop** 2004; 427s: s69-s77.

CLEMENTS KM, BURTON-WURSTER N, LUST G. The spread of cell death from impact damaged cartilage: lack of evidence for the role of nitric oxide and caspases. **Osteoarthritis and Cart** 2004; 12: 577-85.

COHEN NP, FOSTER RJ, MOW VC. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function and Maintaining Healthy State. **JOSPT** 1998; 28 (4): 203-15.

COUTINHO, EL; GOMES, ARS; FRANÇA, CN; SALVINI, TF. A New Model for the Immobilization of the Rat Hind Limb. **Braz J Med Biol Res** 2002; 11 (35): 1329-32.

FELICE JC, COSTA LFC, DUARTE DG, CHAHADE WH. Elementos básicos de diagnóstico da Osteoartrose. **Temas de Reumatologia Clínica** 2002; 3 (3): 68-81.

GUILAK F, JONES WR, TING-BEALL HP, LEE GM. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. **Osteoarthritis and Cart** 1999; 7: 59-70.

GOLDRING MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism** 2000; 43 (9): 1916-26.

HAAPALA J, AROKOSKI JPA, HYTTINEN MM, LAMMI M, MARKKU T, KOVANEN V, HELMINEN HJ, KIVIRANTA I. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. **Clin Orthop** 1999; 1: 218-29.

HAAPALA J, AROKOSKI JPA, RONKKO S, AGREN U, KOSMA V, LOHMANDER LS, TAMMI M, HELMINEN HJ, KIVIRANTA I. Decline After immobilization and recovery after remobilization of sinovial fluid IL1, TIMP, and condroitin sulphate levels in young beagle dogs. **Ann Rheum Dis** 2001; 60: 55-60.

HALL AC, URBAN JPG, GEHL KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. **J Orthop Res** 1991; 9:1-10.

HONG SP, HENDERSON CNR. Articular Cartilage Surface Changes Following Immobilization of the Rat Knee Joint. **Acta Anat** 1996; 157: 27-40.

HUZYKER E B, Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and Cart** 2002; 10: 432-63.

IKENOUE T, TRINDADE MCD, LEE MS, LIN EY, SCHURMAN DJ, GOODMAN SB, SMITH LR. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. **J Orthop Research** 2003; 21:110-6.

JORTIKKA MO, INKINEN RI, TAMMI MI, PARKKINEN J, HAAPALA J, KIVIRANTA I, HELMINEN H, LAMMI MJ. Immobilization causes longlasting matrix changes both in the immobilized and contralateral joint cartilage. **Ann Rheum Dis** 1997; 56: 255-61.

JURVELIN J, KIVIRANTA I, TAMMI M, HELMINEN HJ. Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. **Clin Orthop** 1986; 207:246-52.

KIVIRANTA I, TAMMI M, JURVELIN J, AROKOSKI J, SÄÄMÄNEN AM, HELMINEN HJ. Articular Cartilage Thickness and Glycosaminoglycan Distribution in the Young Canine Knee Joint After Remobilization of the Immobilized Limb. **J Orthop Res** 1994; 12 (2): 161-7.

LE ROUX, MA; CHEUNG, HS; BAU, JL; WANG, JY; HOWELL, DS; SETTON, LA. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis and Cart** 2001; 9: 633- 40.

MANKIN HJ, DORFMAN H, LIPPIELLO L, ZARINS A. 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** 1971; 53: 523-37.

MATTIELLO-ROSA SMG Influência do Exercício em Esteira na Citologia do Líquido Sinovial e Histologia da Cartilagem Articular em Joelhos de Coelhos. **Tese de**

Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.

MOBASHERI A, CARTER SD, MARTIN-VASALLO P, SHAKIBAEI M. Integrins and Stretch activated ion channels; Putative Components of Functional Cell Surface Mechanoreceptors in Articular Chondrocytes. **Cell Biology International**. 2002; 26 (1): 1-18.

NARMONEVA DA, CHEUNG H, WANG JY, HOWELL DS, SETTON LA. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model. **J Orthop Res** 2002; 20:83-91.

OKAZAKI R, SAKAI A, NAKAMURA T, KUNUGITA N, NORIMURA T, SUZUKI K. Effects of Transforming Growth Factor on Articular chondrocytes Obtained from Immobilized Rabbit Knees. **Ann Rheum Dis** 1996; 55: 181-86.

OSTERGAARD K, ANDRESEN CB, PETERSEN J, BENDTZEN K, SALTER DM. Validity of histopatological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. **Ann Rheum Dis** 1999, 58: 208-13.

PALMOSKI M J, BRANDT K D. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. **Arthritis and Rheum** 1981; 24 (11): 1329-37.

PALMOSKI M J, BRANDT K D. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro. **Arthritis Rheum** 1984; 27: 675-81.

SÄÄMANEN AM, TAMMI M, JURVELIN J, KIVIRANTA I, HELMINEN HJ. Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in the articular cartilage of young canine knee (stifle) joint. **J Orthop Res** 1990; 8 (6), 863-73.

SALTER RB. The physiologic basis of continuous passive motion for articular cartilage healing and regeneration. **Hand Clin** 1994; 10, 211-9.

SUH JK, BAEK GH, AROGEN A, MALIN CM, NIYIBIZI C, EVANS CH, WESTERHAUSEN-LARSON A. An intermittent sub ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. **Osteoarthritis and Cartilage** 1999; 7 (1), 71-80.

TYYNI A, KARLSSON J. Biological treatment of joint cartilage damage. **Scand J Med Sci Sports** 2000; 10: 249-65.

TUREK.SL. Ortopedia: Princípios e sua aplicação. São Paulo: Manole, 1999.

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

WALKER JM. Pathomechanics and Classification of Cartilage Lesions, Facilitation of Repair. **JOSPT** 1998; 28 (4): 216-31.

WHITING WC, ZERNICKE RF. **Biomecânica da lesão músculo-esquelética**, Guanabara Koogan, 2001, RJ.

ANEXO I

FIXAÇÃO, DESCALCIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO EM PARAFINA:

- Material fixado em formol à 10%,
- Descalcificado em Ácido nitríco à 7,5% acrescido de glicerina na mesma concentração por aproximadamente 7 dias (95 h),
- Desidratado em série crescente de álcoois (80% á 100%), diafanizado em xilol, incluído e emblocado em parafina, pronto para ser cortado com micrótopo.

ANEXO II

COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA:

- Desparafinizar em xilol,
- Hidratar em série decrescente de álcoois (100% a 80%),
- Lavar em água corrente,
- Corar em Hematoxilina de Harris* por 6min,
- Lavar em água corrente,
- Diferenciar em álcool-ácido,
- Lavar em água corrente,
- Azular em água amoniacal,
- Lavar em água corrente,
- Passar pelo álcool 95%,
- Corar por 1 minuto em Solução Eosina-Floxina**,
- Desidratar em série crescente de álcoois,
- Diafanizar em xilol,
- Montar as lâminas em Entellan.

*Hematoxilina de Harris

Hematoxilina

Álcool Absoluto

Alúmem de Potássio

Água destilada

Óxido Vermelho de Mercúrio

**Solução Eosina-Floxina

Sol."stock" Eosina (eosina amarelada, água destilada).

Sol."stock" Floxina (floxina B, água destilada).

Álcool 95%

Ácido Glacial Acético

ANEXO III

COLORAÇÃO DE SAFRANINA-O *FAST GREEN*

- Desparafinizar,
- Hidratar,
- Corar por 7 min em Hematoxilina de Weigert*,
- Diferenciar em água corrente por 10min,
- Corar na Solução de Safranina-O** á 0,1% por 4min,
- Lavar em água corrente rapidamente,
- Corar na solução de Fast-Green*** à 1% por 2 min,
- Desidratar,
- Diafanizar,
- Montar as lâminas.

***Sol. Hematoxilina Férrica de Weigert**

Solução A

Hematoxilina 1g
Álcool 95% 100ml

Solução B

Água Destilada - 95ml
Ácido Clorídrico concentrado - 1ml
Cloreto de Ferro III ou Cloreto Férrico (30%) -
4ml

Solução de uso: misturar partes iguais da sol.A e da sol.B no momento de uso ou no dia de uso e depois desprezar.

****Sol.Safranina O 0,1%**

Safranina O (Sigma S-2255) 0,1%
Água Destilada - 100ml

A solução de Safranina deve ser preparada no dia do uso e depois desprezada.

*****Sol. Fast Green 0,1%**

Fast Green 0,1g
Água destilada 100ml

ANEXO IV

Sistema de graduação Histológica-Histoquímica para Cartilagem Articular Osteoartrítica, elaborada por Mankin et al, 1971.

Categorias	Subcategoria	Graduação
Estrutura	Normal	0
	Irregularidades de Superfícies	1
	Pannus e Irregularidades de Superfícies	2
	Fendas na zona transicional	3
	Fendas na zona radial	4
	Fendas na zona calcificada	5
	Desorganização completa	6
Células	Normal	0
	Hiper celularidade difusa	1
	Clone	2
	Hipo celularidade	3
Coloração de Safranina-O	Normal	0
	Redução leve	1
	Redução moderada	2
	Redução intensa	3
	Sem coloração perceptível	4
Integridade do tidemark	Intacta	0
	Cruzada por vasos sanguíneos	1
total		0-14

ANEXO V

Esquema de Graduação Histológica para Cartilagem Articular, elaborado por LeRoux et al, 2001.

Parâmetro	Graduação	Descrição
Fibrilação e fenda na Cartilagem Articular	0	Normal
	1	Irregularidades na superfície
	2	1-3 fendas na zona superficial
	3	3 fendas na zona superficial
	4	1-3 fendas na zona transicional
	5	3 fendas na zona transicional
	6	1-3 fendas na zona radial
	7	3 fendas na zona radial
	8	Fendas na zona calcificada
Clone de Condrócitos (zona superficial)	0	Ausência
	1	Pares de clones ocasionais
	2	Densos pares de clones
	3	Agrupamentos de clones
Microfendas (na cartilagem calcificada e osso subcondral).	0	Nenhum
	1	Um
	2	2
Perda de Coloração de proteoglicana	0	Coloração uniforme
	1	Perda na zona superficial por ½ do terço médio
	2	Perda na zona superficial por ½ do terço médio
	3	Perda na zona média por ½ do terço médio
	4	Perda na zona média por ½ do terço médio
	5	Perda em todas as três zonas por ½ do terço médio
	6	Perda em todas as três zonas por ½ do terço médio