

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA**

Adriana Frias Renner

Resposta do condrócito, proteoglicana, colágeno e fibronectina da cartilagem articular, após aplicação de um protocolo de imobilização, alongamento e remobilização articular.

Profa. Dra. Stela Márcia Matiello Gonçalves Rosa

Orientadora

São Carlos

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA**

Adriana Frias Renner

Resposta do condrócito, proteoglicana, colágeno e fibronectina da cartilagem articular, após aplicação de um protocolo de imobilização, alongamento e remobilização articular.

**TESE DE DOUTORADO
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 DOUTOR EM
FISIOTERAPIA – ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO PROCESSOS DE
AVALIAÇÃO E INTERVENÇÃO EM
FISIOTERAPIA.**

Profa. Dra. Stela Márcia Matiello Gonçalves Rosa

Orientadora

São Carlos

2010

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

R414rc

Renner, Adriana Frias.

Resposta do condrócito, proteoglicana, colágeno e fibronectina da cartilagem articular, após aplicação de um protocolo de imobilização, alongamento e remobilização articular / Adriana Frias Renner. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

45 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisioterapia. 2. Cartilagem articular. 3. Imobilização articular. 4. Alongamento muscular. I. Título.

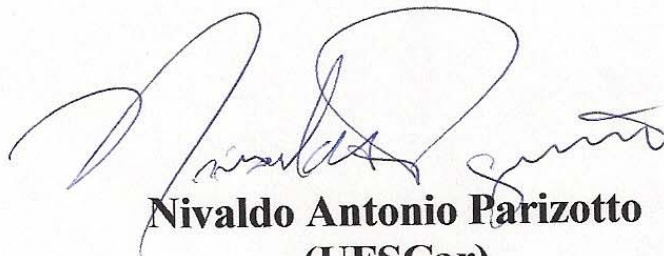
CDD: 615.82 (20^a)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE
Adriana Frias Renner, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 29 DE MARÇO DE 2010.**

BANCA EXAMINADORA:



**Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa
(UFSCar)**



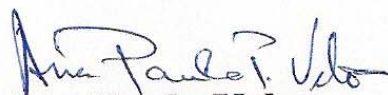
**Nivaldo Antonio Parizotto
(UFSCar)**



**Thiago Luiz de Russo
(UFSCar)**



**Ana Claudia Muniz Rennó
(UNIFESP)**



**Ana Paula Velosa
(USP/SP)**

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Raphael, pelo seu apoio, carinho e parceria.
Sem você seria bem mais difícil a finalização do meu doutorado.

À nossa filha Luisa, um grande presente na minha vida.

Aos meus pais Margarida e Martin.
Sempre estiveram na torcida e,
mesmo com o coração apertado pela distância,
me deram um grande apoio para a concretização deste doutorado.

À minha irmã Mariana pelo ombro amigo,
e infindáveis trocas de experiências

Agradecimento especial à Profª Drª Stela Marcia Mattiello Gonçalves Rosa
pelos ensinamentos, pelo apoio e pela confiança depositada em mim
em parte dessa minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Marilene Castiglia pelo carinho e pela força que sempre me deu.

Ao amigo Filipe pelo carinho.

Às minhas grandes amigas Ana Carolina Evangelista, Ana Carolina Abrão e Carolina Miño, sempre ao meu lado.

Aos amigos e colegas de laboratório Karina, Paula, Carol, Fernando, Michele, Gisele, Giovanna, Anderson, Andressa, Renata e Luis Fernando.

Ao Fernando “Zé” pela prontidão em me ajudar sempre que precisei.

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

Ao Thiago e à Davi pela disponibilidade em ajudar. Sempre um socorro amigo.

À Sabrina pela amizade e pelas nossas boas conversas.

À Anna Raquel e Ana Paula pelos convites e pelas parcerias em pesquisa. Sempre na correria, mas muito importante para mim.

Ao Prof Dr Nivaldo Parizotto pelo espaço aberto em seu laboratório e pelo grande apoio inicial em relação à birrefringência.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Fisioterapia Kelly e Cristiane pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos colegas do Laboratório de Plasticidade Muscular sempre dispostos em ajudar.

À profa Dra Tânia de Fátima Salvini pelo espaço aberto em seu laboratório.

A Tereza pela ajuda técnica e dicas de laboratório.

À Mônica e Deise pelo grande suporte técnico que me deram. Vocês me ensinaram que imunohistoquímica tem seus truques, mas é possível!

Profª Drª Ana Claudia Sverzut pelo espaço aberto em seu laboratório.

À Anabelle pela grande ajuda nos meus primeiros passos no mundo da imunohistoquímica.

À profª Drª Walcy Rosolia Teodoro pelos ensinamentos, pelo espaço aberto em seu laboratório e pela disponibilidade em me ajudar.

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

Ao Prof Dr. Jorge Oishi pela orientação com relação ao tratamento estatístico deste estudo.

À Ana Rocha pelos meus incontáveis telefonemas cheios de dúvidas técnicas sempre atendidos com muito carinho e disposição.

Aos componentes da banca examinadora pelas observações e considerações que contribuíram para o enriquecimento desta tese.

Ao CNPq pela bolsa de estudos que permitiu o desenvolvimento do meu doutorado.

À FAPESP que com o auxílio pesquisa me possibilitou participar da montagem de um laboratório e posteriormente de usufruí-lo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO	5
Influência de Carga Cíclica e Estática sobre as Estruturas da Cartilagem	
Articular.....	7
Influência do alongamento muscular sobre a cartilagem articular	8
3.1. REFERÊNCIAS	9
4. ESTUDO I.....	12
ALONGAMENTO MUSCULAR APÓS IMOBILIZAÇÃO É MAIS BENÉFICO À CARTILAGEM	
ARTICULAR QUANDO REALIZADO EM DIAS ALTERNADOS	12
4.1.1. <i>Resumo</i>	12
4.1.2. <i>Introdução</i>	13
4.1.3. <i>Material e Métodos</i>	15
Grupos experimentais:.....	15
Procedimentos Experimentais:	15
Processamento das Amostras	15
Análises dos cortes:	16
4.1.4. <i>Análise estatística</i>	16
4.1.5. <i>Resultados</i>	17
Celularidade.....	17
Clones	17
Proteoglicanas.....	18
Fibrilas de Colágeno	19
4.1.6. <i>Discussão</i>	22

4.1.7.	<i>Conclusão</i>	24
4.1.8.	<i>Referências bibliográficas:</i>	25
5.	ESTUDO II	28
	COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DA REMOBILIZAÇÃO E DO ALONGAMENTO MUSCULAR APÓS IMOBILIZAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DA FIBRONECTINA, SULFATO DE CONDROITINA NA CARTILAGEM ARTICULAR	28
5.1.1.	<i>Resumo</i>	28
5.1.2.	<i>Introdução</i>	29
5.1.3.	<i>Material e Métodos</i>	31
	Grupos experimentais:.....	31
	Procedimentos Experimentais:	31
	Processamento das Amostras	32
	Imunohistoquímica	32
5.1.4.	<i>Análise Estatística</i>	33
5.1.5.	<i>Resultados</i>	33
	Imunomarcção para Fibronectina	33
	Imunomarcção para sulfato de condroitina 4.....	36
5.1.6.	<i>Discussão</i>	37
5.1.7.	<i>Conclusão</i>	39
5.1.8.	<i>Referências bibliográficas</i>	39
6.	ANEXO I	42
	ARTIGO SUBMETIDO – ESTUDO I: MUSCLE STRETCHING AFTER IMMOBILIZATION IS MORE BENEFICIAL TO ARTICULAR CARTILAGE WHEN APPLIED ON ALTERNATE DAYS... 42	
7.	ANEXO II	43
	ARTIGO SUBMETIDO – ESTUDO II: COMPARISON BETWEEN THE EFFECTS OF REMOBILIZATION AND MUSCLE STRETCHING AFTER IMMOBILIZATION ON THE IMMUNOSTAINING OF FIBRONECTIN AND CHONDROITIN SULFATE IN ARTICULAR CARTILAGE.	43
8.	ANEXO III	44
	ARTIGO PUBLICADO: THE REMODELING OF COLLAGEN FIBERS IN RAT ANKLES SUBMITTED TO IMMOBILIZATION AND MUSCLE STRETCH PROTOCOL.....	44

9. ANEXO IV 45

ARTIGO PUBLICADO: THE EFFECT OF A PASSIVE MUSCLE STRETCHING PROTOCOL ON
THE ARTICULAR CARTILAGE. 45

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Média e desvios padrão da celularidade das patas tratadas. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA7 > I (p= 0,04) e C (p= 0,04). Não foi encontrada diferença entre os demais grupos. 17
- Figura 2: Média e desvios padrão da presença de clones. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA3 > A7 (p=0,003), A3 (p=0,00) e C (p=0,01). ** A3 < I (p=0,04), IA7 (p=0,004), IA3 (p=0,00). Não foi encontrada diferença entre os demais grupos. 18
- Figura 3: Média e desvios padrão da perda de proteoglicanas. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * I > IA3 (p=0,00), A7 (0,00), A3 (p=0,00) e C (p=0,00). ** IA7 > IA3 (p=0,00), A7 (0,00), A3 (p=0,00) e C (0,00). 18
- Figura 4: Painel montado a partir das fotomicrografias apresentando as diferentes graduações da ortocromasia para safranina-o fast green, indicando perda de proteoglicanas, encontradas nos grupos estudados. A: coloração avermelhada caracterizada como normal (graduação 0); B: redução leve da coloração avermelhada do corte (graduação 1 quando em até metade da área total do corte e 2 quando na extensão total do corte) e C: redução intensa da coloração avermelhada (graduação 3 quando em metade da área total do corte e 4 quando na extensão total do corte). Aumento de 400x. 19
- Figura 5: Apresentação das porcentagens de fibras colágenas finas e grossas observadas nas patas tratadas dos diferentes grupos. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. Fibras finas: * I < IA7 (p= 0,00), IA3 (p= 0,00), A7 (p=0,00), A3 (p= 0,00) e C (0,00); ** IA7 < IA3 (p= 0,00), A7 (p= 0,00) e C (p= 0,00); C*** > I (p= 0,00), IA7 (p= 0,00), A3 (p= 0,001). Fibras grossas: + I > IA3 (p=0,00), A7 (p= 0,009); ++ IA3 < I (p= 0,00), IA7 (0,008), C (p= 0,00); +++ C > IA7 (p= 0,01), IA3 (p= 0,00), A7 (0,00), A3 (p=0,001). 20

Figura 6: Fotomicrografias de cortes histológicos das articulações talo crurais dos animais dos diferentes grupos estudados. Todas foram coradas com picrossírius red e visualizadas sob luz polarizada. Os tons laranja avermelhados representam as fibrilas grossas de colágeno e os tons esverdeados, as fibrilas finas. A: um animal do grupo I apresentando predominantemente coloração laranja/avermelhada (seta), há redução da proporção da coloração esverdeada. B: animal do grupo IA7 com predomínio da coloração alaranjada (seta). C: animal do grupo IA3, com redução da coloração alaranjada e aumento da proporção de coloração esverdeada (cabeça de seta). D: animal do grupo A7, com coloração alaranjada (seta) e coloração esverdeada (cabeça de seta). E: animal do grupo A3, coloração alaranjada (seta) e coloração esverdeada (cabeça de seta). F: animal do grupo C, proporção normal da coloração alaranjada (seta) e coloração esverdeada (cabeça de seta). Aumento de 400X. 21

Figura 7: Fotomicrografia de reação de imunohistoquímica para fibronectina. A: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fracamente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo Remobilizado. B: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo IA3. C: marcação fracamente positiva na camada calcificada (seta) e na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo A3. D: marcação fracamente positiva na camada calcificada (seta) e também na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo controle. Aumento de 400x. 34

Figura 8: Média da graduação para fibronectina na camada calcificada. R= remobilizados, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA3 > A3 (p=0,03), e C (p=0,00)..... 35

Figura 9: Média da graduação para fibronectina na camada não calcificada. R= remobilizados, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA3 > I (0,00), A3 (p=0,00), e C (p=0,00)..... 35

Figura 10: fotomicrografia da reação imunohistoquímica para sulfato de condroitina 4. Em A: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na não calcificada(cabeça de seta)de um animal do grupo remobilizado. Em B: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na não calcificada (cabeça de seta) de um animal do grupo IA3. Em C imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na não calcificada (cabeça de seta) de um animal do grupo controle. Aumento de 400x..... 36

Figura 11: Média das graduações para sulfato de condroitina 4 nas camadas não calcificadas e camadas calcificadas. R= remobilizados, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. Não houve diferença estatística nas comparações entre os diferentes grupos. 37

1. RESUMO

A função da cartilagem articular é dependente do condrócito e dos componentes de sua matriz extracelular, que por sua vez, podem ser regulados por estímulos mecânicos. Assim, alterações no suporte de carga podem afetar sua composição ou sua estrutura e interferir na sua capacidade funcional de sustentar e distribuir cargas e minimizar os estresses de contato. Desta forma, investigações dos componentes da cartilagem articular, como o condrócito e os componentes da matriz são essenciais para prevenção e tratamento de doenças articulares. É necessário um maior entendimento das relações de uso/desuso e degeneração, assim como das conseqüências que situações como estresse de cisalhamento, carga estática prolongada ou ausência de carga possam gerar neste tecido. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta do condrócito, proteoglicana, colágeno e fibronectina da cartilagem articular, após aplicação de um protocolo de imobilização, alongamento e remobilização articular. Material e Métodos: foram utilizados 36 animais divididos em 6 grupos (n=6): imobilizado (I), imobilizado e alongado 7 dias por semana (IA7), imobilizado e alongado 3 dias por semana (IA3), alongado 7 dias por semana (A7), alongado 3 dias por semana (A3), e controle (C). Os grupos I, IA7 e IA3 foram submetidos a 4 semanas de imobilização da pata traseira esquerda. Os grupos IA7 e IA3, após a imobilização, foram submetidos a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda diariamente ou 3 vezes por semana, respectivamente. Os grupos A7 e A3 permaneceram livres na gaiola por 4 semanas e posteriormente foram submetidos a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda diariamente ou em dias alternados, respectivamente. Após esses procedimentos, os tornozelos esquerdos foram coletados, descalcificados, processados em parafina e corados com H&E, Safranina, Picrossirius Red e imunomarcados para fibronectina e sulfato de condroitina 4 para posterior análise. Foram avaliados por dois observadores parâmetros como: celularidade, contagem de clones, perda de proteoglicanos, conteúdo de fibrilas finas e grossas de colágeno e expressão de fibronectina e sulfato de condroitina 4. Para comparação destes parâmetros entre os diferentes grupos foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Kruskal Wallis com post hoc Newman Keuls: formação de clones e conteúdo de proteoglicanos; Comparações múltiplas de Duncan: avaliação morfométrica de celularidade e Anova com post hoc de Tukey: proporção das fibrilas finas e grossas

de colágeno. Para análise das reações de imunohistoquímica para fibronectina e sulfato de condroitina 4 foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e post hoc Newman Keuls. Em todos os testes o nível de significância foi de $p \leq 0,05$. Resultados: com relação a celularidade o grupo IA7 apresentou aumento significativo da celularidade em relação aos grupos I e C. O grupo IA3 também apresentou alteração celular significativa com formação de clones em relação aos grupos A7, A3 e C. A maior perda significativa de proteoglicanas foi do grupo IA7 em relação a todos os outros grupos. O grupo I também perdeu significativamente mais proteoglicanas que os demais, somente não com relação ao grupo IA7. Com relação às fibrilas colágenas foi observado que a imobilização (I) reduziu significativamente as fibrilas finas em relação aos grupos IA3, A7, A3 e C. Já a quantidade de fibrilas grossas sofreu influência da sobrecarga mecânica, pois que houve diminuição significativa das mesmas em todos os grupos em relação ao controle. Com relação aos achados de fibronectina, os grupos imobilizados e alongados (IA7 e IA3) apresentaram significativamente maior intensidade de marcação desta que os outros grupos. Não houve diferença estatística das imunomarcações para sulfato de condroitina 4 entre os diferentes grupos. Conclusão: Os protocolos de alongamento muscular, após imobilização, realizados em dias alternados e diariamente, provocaram respostas adaptativas distintas na cartilagem articular. A imobilização desencadeou um quadro de atrofia tecidual que quando estimulada por alongamentos musculares em dias alternados, manteve alguns componentes da matriz, como fibrilas finas de colágeno e proteoglicana. Esta resposta foi agravada quando o mesmo protocolo foi aplicado diariamente. Desta forma, podemos concluir que o alongamento muscular aplicado em articulações previamente imobilizadas deve ser aplicado com cautela, respeitando períodos intercalados de estímulo mecânico.

Palavras Chave: Cartilagem Articular, Colágeno, Proteoglicana, Fibronectina, Fisioterapia

2. ABSTRACT

The function of articular cartilage depends on the chondrocytes and on the components of the extracellular matrix, which in turn may be regulated by mechanical stimuli. Thus, changes in load support may affect its composition or its structure and interfere with their functional ability to sustain and distribute loads and minimize the stresses of contact. Thus, investigations of articular cartilage components, such as chondrocyte and or matrix components are essential for prevention and treatment of arthritic disease. A greater understanding of the relationship of use / disuse and degeneration as well as the consequences of situations such as shear stress, static load or unloading can generate in this tissue. The aim of this study was to evaluate the response of chondrocytes, proteoglycan, collagen and fibronectin in articular cartilage after application of a protocol of immobilization, stretching and joint remobilization. Material and Methods: We used 36 animals divided into six groups (n = 6): immobilized (I), immobilized and stretched seven days per week (IS7), immobilized and stretched three days per week (IS3), stretched seven days per week (S7), stretched three days per week (S3) and control (C). Groups I, IS3 and AS7 underwent four weeks of immobilization of the left hind limbs. Groups IS7 and IS3, after immobilization, were subjected to three weeks of the posterior muscle stretching of the left hind leg daily or three times per week, respectively. The S3 and S7 groups remained free in the cage for 4 weeks and subsequently underwent three weeks of posterior muscle stretching of the left hind limb daily or three times per week, respectively. After these procedures, the left ankle were collected, decalcified, processed in paraffin and stained with H&E, Safranin-O, Picrossiruius Red and immunostained with fibronectin and chondroitin sulfate 4 for further analysis. Two observers evaluated parameters such as chondrocyte cloning, loss of proteoglycan content, thin and thick fibrils collagen content, intensity of staining for fibronectin and chondroitin sulfate 4. For statistical analysis we used the following tests: Kruskal Wallis and post hoc Newman Keuls: cloning and the proteoglycan content of the different groups); Duncan multiple comparison: morphometric evaluation of cellularity; ANOVA and post hoc Tukey: proportion of thin and thick fibrils of collagen. For analysis of the immunohistochemistry reactions of fibronectin and chondroitin sulfate 4 it was used nonparametric test Kruskal Wallis and post hoc Newman Keuls. In all tests the significance level was $p \leq 0.05$. Results: With respect to

the cellularity IS7 group showed significant increase in cellularity compared to groups I and C. The IS3 group also showed significant cellular change with the formation of chondrocyte cloning compared to groups S7, S3 and C. The most significant loss of proteoglycan was in IS7 group compared to all other groups. The I group also lost significantly more proteoglycan than the others, except for IS7 group. With respect to collagen fibrils was observed that immobilization (I) significantly reduced the thin fibrils in relation to groups IS3, S7, S3 and C. The quantity of thick fibrils was influenced by mechanical overload, as there was a significant decrease of it in all groups compared to control. With respect to the findings of the fibronectin, the groups immobilized and stretched (IS3 and IS7) had significantly higher intensity staining of fibronectin than other groups. There was no statistical difference of chondroitin sulfate 4 immunostaining among the different groups. Conclusion: The protocols of muscle stretching after immobilization, applied on alternate days and daily provoked distinct adaptive responses in articular cartilage. The immobilization stimulated tissue atrophy that when stimulated by muscle stretching on alternate days, kept some matrix components, such as fine fibrils of collagen and proteoglycan, unlike the protocol used daily. Thus we can conclude that muscle stretching applied in previously immobilized joints should be applied with caution, on alternate days of mechanical stimulation.

Key words: articular cartilage, collagen, proteoglycan, fibronectin, physical therapy.

3. INTRODUÇÃO

A cartilagem articular é um tecido conectivo especializado que tem como funções principais absorver e distribuir cargas. Ela é composta por condrócitos, seu tipo específico de célula, e pelos componentes de sua matriz extracelular. Ambos são influenciados e regulados por estímulos mecânicos. Sendo assim, alterações no suporte de carga podem afetar a composição e a estrutura da cartilagem. Tais alterações, por sua vez, podem interferir na sua capacidade funcional de sustentar e distribuir cargas e minimizar os estresses de contato. Desta forma, investigações destes componentes da cartilagem articular são essenciais para prevenção e tratamento de doenças articulares. É necessário um maior entendimento das relações de uso/desuso e degeneração, assim como das conseqüências que situações como estresse de cisalhamento, carga estática prolongada ou ausência de carga possam gerar neste tecido^{1,2,3}.

O condrócito é responsável pela biosíntese e *turnover* contínuos das macromoléculas da matriz extracelular. Isso ocorre a fim de manter a homeostase do tecido. O condrócito ocupa 3% a 5% do volume tecidual dependendo da idade e localização da cartilagem estudada^{4,5}. Já a matriz extracelular, abundante na cartilagem, 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 macromolécula predominantemente encontrada na matriz é o colágeno (60%), principalmente do tipo II. Entretanto, também estão presentes os tipos V, VI, IX, X, XI, XII e XV em menores quantidades. Estes colágenos se encontram embebidos em um firme gel hidratado de proteoglicanas^{4,5}.

Já 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. A forma agregada é composta de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatada) com múltiplos monômeros de proteoglicana ligados a ele. Componentes importantes das proteoglicanas, as GAGs são formadas por polissacarídeos sulfato de condroitina 4 e 6 e querato sulfato^{2,6,7,8}. O agrecano é a maior proteoglicana de sustentação de peso da matriz extracelular presente na cartilagem articular. É essa molécula que permite a

resistência à compressão tecidual através de interações eletrostáticas e de pressões de tumefação osmótica, resistindo à perda de fluidos. Além disso, agregados de agreganos permanecem densamente entrelaçados na rede de fibrilas colágenas, que têm como função resistir às forças de deformação tênsil e de cisalhamento da cartilagem⁹.

A fibronectina é uma glicoproteína presente em pequena quantidade na matriz extracelular da cartilagem articular normal. Entretanto, Zack et al (2006) descrevem que em culturas de fragmentos de cartilagem osteoartrítica pode haver até 10 vezes mais fibronectina do que na cartilagem normal. Ela possui domínios funcionais distintos que podem se ligar a integrinas, heparina, fibrina e colágeno. Como resultado da atividade desses muitos domínios funcionais, esta glicoproteína está envolvida em uma grande quantidade de processos biológicos como migração celular, reparo, angiogenese e diferenciação celular^{10,11}.

Como descrito anteriormente, a cartilagem articular, quando submetida a forças de compressão mecânica, carga de cisalhamento, pressão hidrostática e carga osmótica, apresenta alterações na transcrição gênica do condrócito, sinalização celular e biosíntese das macromoléculas da matriz extracelular^{9,12}. Entretanto, a resposta do condrócito depende da associação de fatores como frequência, magnitude e tempo de aplicação da carga compressiva^{3,13}. Dentre as diferentes formas de aplicação de compressão mecânica, de uma forma geral, a compressão estática tem sido apontada como fator de diminuição de síntese, enquanto que a compressão dinâmica em uma determinada frequência pode estimular síntese de matriz⁹.

Entretanto, se for aplicada uma carga mecânica na cartilagem articular, mesmo que superficialmente mas que lese condrócitos, esta limitará a capacidade metabólica de reparo da cartilagem, levando a uma concentração diminuída de proteoglicanas, hidratação aumentada e alteração da organização das fibrilas de colágeno⁸. O que tem sido observado, é que após aplicação de cargas na cartilagem articular, a diminuição do conteúdo de proteoglicanas parece ser uma das primeiras anormalidades detectáveis na cartilagem articular, aparecendo antes mesmo de sinais visíveis de deteriorização de sua superfície¹⁴. Outra alteração que ocorre com a cartilagem articular sob processos lesivos mais avançados é a diminuição do colágeno tipo II, ou até sua substituição por colágeno tipo I em uma tentativa de reparo¹⁵.

Influência de Carga Cíclica e Estática sobre as Estruturas da Cartilagem Articular

Sabe-se que a percepção do meio mecânico pelo condrócito se dá pela interação biológica e biofísica entre o mesmo e sua matriz extracelular¹⁶. Forças mecânicas têm grande influência na síntese e taxa de turnover de moléculas da cartilagem articular, como as proteoglicanas. Estudos relatam que uma carga cíclica regular aplicada na articulação aumenta a síntese de proteoglicanas e mantém a rigidez fisiológica da cartilagem. Por outro lado, uma compressão contínua diminui essa síntese e causa lesão do tecido através de necrose¹⁷.

Em um estudo realizado por Thibault et al (2002) foram investigadas a quebra de colágeno, seu consequente turnover, as alterações dos agreganos e as alterações das propriedades mecânicas, resultantes da aplicação de cargas mecânicas *in vitro* a fragmentos de cartilagem. Essas avaliações foram realizadas antes da aplicação das cargas, logo após a aplicação e 10 dias após a aplicação, em fragmentos mantidos em cultura sem aplicação de cargas adicionais nesses 10 dias. Em alguns fragmentos foram aplicadas cargas entre 2 e 5 MPa e em outros uma carga entre 5 e 8 MPa (todas consideradas altas, porém fisiológicas). Testes mecânicos realizados antes e após o período de aplicação das cargas cíclicas, mostraram um enfraquecimento da rede colágena e uma permeabilidade aumentada pela carga cíclica. Nos fragmentos avaliados imediatamente após a aplicação da carga, as alterações da matriz extracelular, induzidas pela carga, foram evidenciadas claramente por um aumento no colágeno desnaturado. Já os fragmentos mantidos em cultura por 10 dias, sem intervenção após a aplicação da carga cíclica, não expressaram o aumento na desnaturação do colágeno. Segundo os autores, isso pode representar *turnover*, reparo ou o início de degradação progressiva¹⁸.

Waldman et al (2003) aplicaram carga de cisalhamento estático e dinâmico em tecido cartilaginoso formado *in vitro*. Após realizarem a cultura dos condrócitos por quatro semanas as aplicações das cargas foram iniciadas. Foram avaliadas a síntese de colágeno e proteoglicana e as propriedades mecânicas em culturas após quatro semanas de estímulo. Neste estudo, existiam amostras submetidas a cargas de cisalhamento estático (400s), dinâmico (400 ciclos de 1Hz) e controle (sem estímulo). As amostras submetidas às forças estáticas apresentaram menor conteúdo de proteoglicanas e colágeno que as amostras não estimuladas. Já o mesmo período e duração de forças dinâmicas de cisalhamento aplicadas em outras amostras, geraram nas mesmas um conteúdo de colágeno e proteoglicanas 40% e 35%, respectivamente, maiores quando

comparados com as amostras não estimuladas. Quanto às propriedades mecânicas, as amostras submetidas às cargas de cisalhamento dinâmico apresentaram aumento significativo da capacidade de sustentação de carga compressiva e aumento na rigidez, ambas comparadas com o grupo controle¹⁹.

Já Hall et al (1991) obtiveram resultados positivos de síntese de proteoglicanas ao realizarem compressões estáticas em fragmentos de cartilagem bovina, com magnitudes consideradas fisiológicas de 5 e 10Mpa, por 20s e 2h,. Quando essa compressão aumentou para 20Mpa, a biossíntese foi significativamente suprimida na exposição de 2h, mas não na exposição de 20s²⁰. Ikenoue et al (2003), através de pressão hidrostática intermitente em culturas de condrócitos, obtiveram respostas positivas conforme o período de aplicação do protocolo. Foi observado aumento de sinal para síntese de agrecano 4 horas após a aplicação de compressões de 1Hz com magnitudes 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 compressão¹³.

Os estudos citados anteriormente controlaram a carga, frequência e duração, entretanto se distanciam da realidade da carga aplicada no tecido cartilaginoso de humanos durante atividade física, já que são realizados em cultura de células. Estudos com humanos controlando tais variáveis são escassos. Uma forma semelhante de pressão hidrostática intermitente aplicada em humanos é o movimento passivo contínuo; observações clínicas sobre a eficácia deste recurso foram observadas por Salter (1994)²¹.

Influência do alongamento muscular sobre a cartilagem articular

O alongamento muscular cíclico é um recurso terapêutico utilizado na reabilitação, para aumento da amplitude de movimento de sujeitos previamente submetidos à imobilização ou não.

Durante protocolos de alongamento muscular, as forças compressivas estáticas realizadas possuem diferentes durações e magnitudes de compressão. Entretanto, o efeito do alongamento muscular, muito utilizado na reabilitação, tem sido pouco estudado na cartilagem articular. 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 a compressão e respondem às cargas aplicadas alterando seu estado metabólico^{22,23}.

Em estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa no qual foi desenvolvida esta tese (Renner et al, 2006), foi utilizado um protocolo de quatro semanas de imobilização talocrural seguido de três semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira em ratos. O protocolo de alongamento consistia em flexão dorsal máxima com 10 repetições de 60s, intercaladas por 30s de relaxamento. O protocolo foi aplicado uma vez ao dia durante três semanas. Os resultados encontrados mostraram danos na cartilagem articular dos tornozelos previamente imobilizados e posteriormente submetidos ao alongamento muscular. Foram avaliados celularidade, clone de condrócitos, conteúdo de proteoglicanas, medidas da espessura da cartilagem e contagem de condrócitos. As respostas encontradas foram diminuição significativa no conteúdo de proteoglicanas e aumento na celularidade no grupo submetido ao alongamento após imobilização, quando comparado ao grupo que foi apenas submetido à imobilização e ao grupo apenas submetido ao alongamento. Essas importantes alterações teciduais são compatíveis com respostas degenerativas e podem estar diretamente relacionadas à magnitude da compressão, bem como à duração dos estímulos³. Alterações na quantidade de colágeno, bem como em sua orientação podem fortalecer as evidências de prejuízo e indicar, de forma indireta, a perpetuação da lesão por perda da qualidade biomecânica do tecido. Portanto, é necessário que seja investigado o comportamento do colágeno e de outros componentes da matriz extracelular frente a esse método terapêutico, bem como que seja estabelecido um parâmetro terapêutico não lesivo à cartilagem para o alongamento muscular.

3.1. REFERÊNCIAS

1. Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. 1998. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function and Maintaining Healthy State. *JOSPT*; 28: 203-15.
2. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. 2002. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 408-419.
3. Renner AF; Carvalho E; Soares E; Mattiello-Rosa S. 2006. The Effect of a Passive Muscle Stretching Protocol on the Articular Cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 14: 196-202.

4. Gilmore RS, Palfrey AJ. 1988. Chondrocyte distribution in the articular cartilage of human femoral condyles. *J Anat* 157: 23-31.
5. Archer CW & Francis-West P. 2003. The chondrocyte. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology* 35: 401-4.
6. Goldring MB. 2000. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 43: 1916-26.
7. Tyyni A, Karlsson J. 2000. Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports* 10: 249-65.
8. Alford JW, Cole BJ. 2005. Cartilage Restoration, Part 1. *American Journal of Sports Medicine* 33.
9. Szafranki JD, Grodzinsky AJ, Burger E, et al. 2004 Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthritis and Cartilage* 12: 937-46.
10. Alberts et al. *Biologia Molecular da Célula*, 4 ed, Artmed, 2002.
11. Zack MD, Arner EC, Anglin CP, et al. 2006. Identification of Fibronectin Neoepitopes. *Arthritis Rheum* 54: 2912-22.
12. Li KW, Wang AS, Sah RL. 2003. Microenvironment regulation of extracellular signal-regulated kinase activity in chondrocytes: effects of culture configuration, interleukin-1, and compressive stress. *Arthritis Rheum* 48: 698-99.
13. Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS, et al. 2003. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J Orthop Research* 21:110-6.
14. Narmoneva DA, Cheung H, Wang JY, et al. 2003. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model. *J Orthop Res* 20:83-91.
15. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, et al. 2006. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 14: 13-29.
16. Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. 1999. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cart* 7: 59-70.

17. Arokoski JPA, Jurvelin JS, Vaatainen U, Helminen HJ. 2000. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10: 186-98.
18. Thibault M, Poole AR, Buschmann MD. 2002. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 20: 1265-73.
19. Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD, et al. 2003. *J Orthop Res* 21: 590-6.
20. Hall AC, Urban JPG, Gohl KA. 1991. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res* 9:1-10.
21. Salter RB. 1994. The physiologic basis of continuous passive motion for articular cartilage healing and regeneration. *Hand Clin* 10: 211-9.
22. Suh JK, Baek GH, Arojen A, et al. 1999. An intermittent sub ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis and Cartilage* 7: 71-80.
23. Mobasheri A, Carter SD, Martin-Vasallo P, Shakibaei M. 2002 Integrins and Stretch activated ion channels; Putative Components of Functional Cell Surface Mechanoreceptors in Articular Chondrocytes. *Cell Biology International*. 26: 1-18.

4. ESTUDO I

ALONGAMENTO MUSCULAR APÓS IMOBILIZAÇÃO É MAIS BENÉFICO À CARTILAGEM ARTICULAR QUANDO REALIZADO EM DIAS ALTERNADOS

Adriana Frias Renner, Fernando Augusto Vasilceac, Carolina Kalil Dias, Anderson Amaro dos Santos, Walcy Rosolia Teodoro, Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa

4.1.1. RESUMO

O alongamento muscular é um recurso terapêutico utilizado na reabilitação após protocolos de imobilização articular. Objetivo: comparar a resposta da cartilagem articular frente a um alongamento muscular aplicado diariamente a um aplicado em dias alternados, ambos após imobilização. Material e Métodos: foram utilizados 36 animais divididos em 6 grupos (n=6): imobilizado (I), imobilizado e alongado 7 dias por semana (IA7), imobilizado e alongado 3 dias por semana (IA3), alongado 7 dias por semana (A7), alongado 3 dias por semana (A3), e controle (C). Os grupos I, IA7 e IA3 foram submetidos a 4 semanas de imobilização da pata traseira esquerda. Os grupos IA7 e IA3, após a imobilização, foram submetidos a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, diariamente e 3 vezes por semana, respectivamente. Os grupos A7 e A3 permaneceram livres na gaiola por 4 semanas e posteriormente foram submetidos a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, diariamente e 3 vezes por semana, respectivamente. No grupo C não foi realizada nenhuma intervenção. Após esses procedimentos, foi realizada eutanásia, os tornozelos esquerdos foram coletados e processados em parafina e corados com H&E, Safranina e Picrossirius Red para análise. Foram avaliados por dois observadores, sem conhecimento prévio dos grupos, parâmetros como celularidade, contagem de clones, perda de proteoglicanos e conteúdo de fibrilas finas e grossas de colágeno. Para análise estatística foram utilizados os seguintes testes: Kruskal Wallis com post hoc Newman Keuls para formação de clones e conteúdo de proteoglicanas, comparações múltiplas de Duncan para avaliação morfométrica de celularidade e Anova com post hoc de Tukey para proporção das fibrilas finas e grossas de colágeno. Em todos os testes o nível de significância foi de $p \leq 0,05$. Resultados: com relação a celularidade, o grupo IA7 apresentou aumento significativo da celularidade quando

comparado aos grupos I e C. O grupo IA3 também apresentou alteração celular significativa com formação de clones quando comparado com os grupos A7, A3 e C. A maior perda significativa de proteoglicanas foi do grupo IA7, em relação a todos os outros grupos. O grupo I também perdeu significativamente mais proteoglicanas que os demais, com exceção do IA7. Com relação às fibrilas de colágeno foi observado que a imobilização (I) reduziu significativamente as fibrilas finas em relação aos grupos IA3, A7, A3 e C. Já a quantidade de fibrilas grossas sofreu influência da sobrecarga mecânica, já que houve diminuição significativa das mesmas em todos os grupos em relação ao controle. Conclusão: O protocolo de alongamento muscular após imobilização realizado nesse estudo foi prejudicial à cartilagem articular, já que houve alteração celular, perda de proteoglicanas e redução das fibrilas finas e grossas de colágeno. Entretanto, sua intervenção em dias alternados foi menos lesiva, tendo em vista a manutenção das proteoglicanas e das fibras finas de colágeno.

4.1.2. INTRODUÇÃO

Uma evidência presente na prática da reabilitação é que a imobilização articular prolongada reduz a amplitude de movimento. Segundo Trudel et al (2008), essa redução da amplitude de movimento é causada por uma contratura articular que se dá por influência de estruturas articulares (artrogênica) e musculares (miogênica). A influência do componente artrogênico na contratura articular, aumenta de maneira linear continuamente enquanto é mantida a imobilização. Para os autores as hipóteses sobre os componentes articulares envolvidos na restrição artrogênica são: a proliferação de tecido conectivo, alterações colágenas e encurtamento da cápsula articular. Com relação ao componente miogênico, os autores relatam uma maior influência das estruturas musculares apenas nas primeiras semanas da imobilização. Após 16 a 32 semanas, relatam haver um predomínio artrogênico como fator limitante da amplitude de movimento¹.

Um estudo recente em modelo animal, investigando contratura articular após imobilização, descreve que após 8 semanas de imobilização não houve recuperação da amplitude de movimento, quando a única alternativa terapêutica aplicada foi a remobilização. Os autores desse estudo discutem que a presença de uma reversibilidade incompleta das contraturas articulares demonstra a necessidade de um tratamento ativo nas articulações imobilizadas².

Baseados no encurtamento muscular (componente miogênico da restrição articular) que ocorre após períodos de imobilização, os protocolos de alongamento muscular são alternativas terapêuticas nos pacientes previamente imobilizados. Entretanto, é importante ter em mente que o alongamento muscular provoca, em diferentes magnitudes, compressão na cartilagem articular através da carga mecânica resultante desse movimento articular ativo³.

A influência dessas cargas mecânicas na cartilagem articular tem sido amplamente estudada. Elas influenciam a estrutura e organização dos componentes da matriz extracelular da cartilagem. Como o condrócito percebe seu meio e essas influências mecânicas através de interações biológicas e biofísicas complexas com sua matriz extracelular, as cargas mecânicas também acabam influenciando nas taxas de síntese/degradação dos diferentes componentes da matriz extracelular^{4,5,6,7,8,9}.

Além do estudo das cargas, muitos pesquisadores também já investigaram as alterações na cartilagem provocadas pela imobilização^{10,11,22}. Entre os resultados, é observada diminuição na espessura⁸, amaciamento da cartilagem^{10,11}, diminuição do conteúdo de proteoglicanas^{13,14,11} e redução das ligações cruzadas do colágeno^{13,14}. Segundo Brandt et al (2003), a imobilização articular gera alterações atróficas na cartilagem articular¹⁵.

Um estudo prévio, realizado pelo presente grupo, investigou a resposta de um protocolo de alongamento muscular realizado diariamente em animais previamente imobilizados³. De acordo com os resultados, o alongamento muscular aplicado diariamente após período de imobilização foi prejudicial à cartilagem articular em alguns parâmetros estudados. Baseado nos resultados do estudo anterior do grupo, foi considerado que dados como o período e intervalos entre as intervenções *in vivo* ainda necessitam de maiores investigações. Além disso, permanece a questão sobre a influências destas intervenções sobre o colágeno.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo comparar a resposta da cartilagem articular frente a um protocolo de alongamento muscular aplicado diariamente e a um protocolo aplicado em dias alternados, após um período de imobilização articular.

4.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais:

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, adultos jovens pesando em média $280g \pm 25,4g$. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas em biotério do departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob condições controladas de luz (ciclo 12:12h) e temperatura ($22 \pm 2^\circ C$) e acesso livre a água e ração peletizada. O estudo obteve aprovação do comitê de ética em pesquisa animal desta instituição (Protocolo CEEA: 15/20006).

Procedimentos Experimentais:

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=6): imobilizado (I), imobilizado e alongado 7 dias por semana (IA7), imobilizado e alongado 3 dias por semana (IA3), alongado 7 dias por semana (A7), alongado 3 dias por semana (A3), e controle (C).

Os grupos I, IA7 e IA3 foram submetidos a 4 semanas de imobilização, em flexão plantar das articulações talocrurais das suas patas posteriores esquerdas, com modelo previamente utilizado^{3,16}. Após a retirada do aparato de imobilização, o grupo I permaneceu livre na gaiola por três semanas, e os grupos IA7 e IA3 foram submetidos a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, diariamente e 3 vezes por semana, respectivamente.

Os grupos A7 e A3 permaneceram livres na gaiola por 4 semanas e posteriormente foram submetidos a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, diariamente ou 3 vezes por semana, respectivamente. No protocolo de alongamento muscular, realizado sob anestesia (ketamina, 95mg/kg e xilazina, 12 mg/kg), o tornozelo posterior esquerdo foi mantido em flexão dorsal máxima por 10 repetições de 60s, com intervalos de 30s de repouso entre eles. O grupo C permaneceu livre na gaiola durante as 7 semanas do experimento

Processamento das Amostras

Ao final das sete semanas, os animais foram eutanasiados com overdose anestésica e seus tornozelos esquerdos foram coletados, fixados com formol tamponado (10%), descalcificados com ácido nítrico 7,5% acrescido de glicerina (70ml/l de solução) e processados em parafina. Com o uso de um micrômetro, foram realizados

cortes de 6 μm , que foram montados em lâminas tratadas com aminosilane. As amostras foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E), Safranina O fast green e Picrossirius Red para as análises.

Análises dos cortes:

Através da coloração de H&E foi realizada a contagem de clones ao longo da extensão de cada corte. Também foi realizada a avaliação morfológica da celularidade da cartilagem, utilizando-se o software de análise de imagens Axiovision rel 4.7 (Carl Zeiss). Inicialmente foi delimitada uma área central do corte de 40.000 μm^2 para posterior contagem dos condrócitos³.

Nos cortes corados com Safranina O *fast green*, foi realizada a mesma classificação do estudo anterior³. A classificação consistia em normal (grau 0) com a cartilagem avermelhada, passando por perda leve em até metade da área total (grau 1), perda leve na extensão total (grau 2), perda importante em até metade da extensão total (grau 3) até perda importante das proteoglicanas (grau 4), quando o tecido não apresentava nenhuma coloração avermelhada em toda sua extensão. Já os cortes corados com Picrosirius Red foram avaliados em microscópio de luz polarizada, através do *software* Image Pro Plus (Olympus), com aumento de 400X. As fibras de colágeno coradas com Picrosirius Red (específico para detecção do colágeno), visualizadas sob luz polarizada, apresentam uma coloração dependente da espessura das fibras e de seu estado de agregação. Com o aumento da espessura e da agregação física, a cor varia de verde para amarelo, laranja até a cor vermelha nas fibrilas mais grossas^{18,19,20}. Através do software, as imagens amarelo/esverdeadas foram definidas como de fibrilas finas e as laranja/avermelhadas definidas como de fibrilas grossas. As áreas identificadas pelo software, correspondentes a fibrilas finas e fibrilas grossas de colágeno, foram divididas pela área total analisada e o resultado final foi expresso em porcentagem. Obtivemos assim, a porcentagem de fibrilas finas e a de fibrilas grossas da área total avaliada para cada grupo estudado.

4.1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação da classificação de clones e conteúdo de proteoglicanas entre os diferentes grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com post hoc Newman Keuls. Para as comparações intergrupos da avaliação morfológica

de celularidade, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Duncan. A avaliação da proporção das fibrilas finas e grossas de colágeno nos diferentes grupos foi realizada através do teste de Anova com post hoc de Tukey. Em todos os testes o nível de significância foi de $p \leq 0,05$.

4.1.5. RESULTADOS

Não foram observadas ulcerações de pele ou edemas nos pés após remoção do aparato de imobilização. Na avaliação macroscópica das articulações, não foram observadas erosões, osteófitos, irregularidades de superfície ou fissuras nos diferentes grupos.

Celularidade

A celularidade das cartilagens articulares do grupo submetido à imobilização e posterior alongamento diário (IA7) aumentou quando comparado aos grupos imobilizado (I) ($p = 0,04$) e controle (C) ($p = 0,04$), como ilustrado na Figura 1.

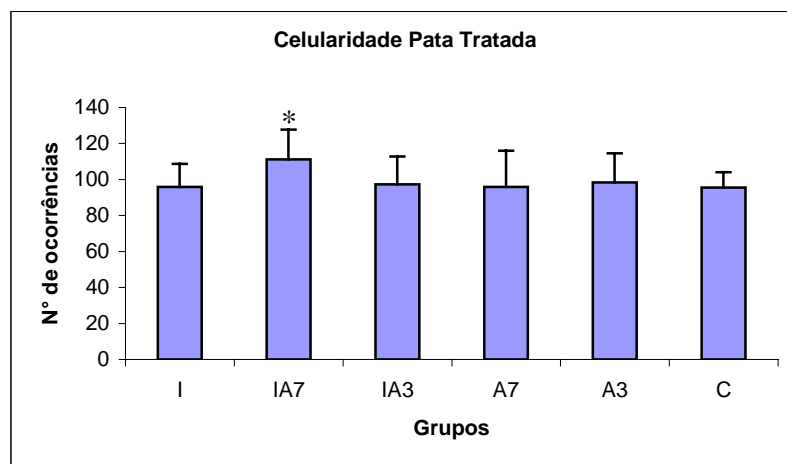


Figura 1: Média e desvios padrão da celularidade das patas tratadas. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA7 > I ($p = 0,04$) e C ($p = 0,04$). Não foi encontrada diferença entre os demais grupos.

Clones

Os animais do grupo imobilizado e alongado três dias por semana (IA3) também apresentaram alteração celular. Houve aumento significativo na formação de clones em relação aos grupos alongado diariamente A7 ($p=0,003$), alongado em dias

alternados A3 ($p=0,00$) e controle C($p=0,01$). Outro achado foi que o grupo alongado em dias alternados apresentou menor quantidade de clones que os grupos I ($p=0,04$), IA7($p=0,00$) e IA3($p=0,00$). Os resultados estão ilustrados na Figura 2.

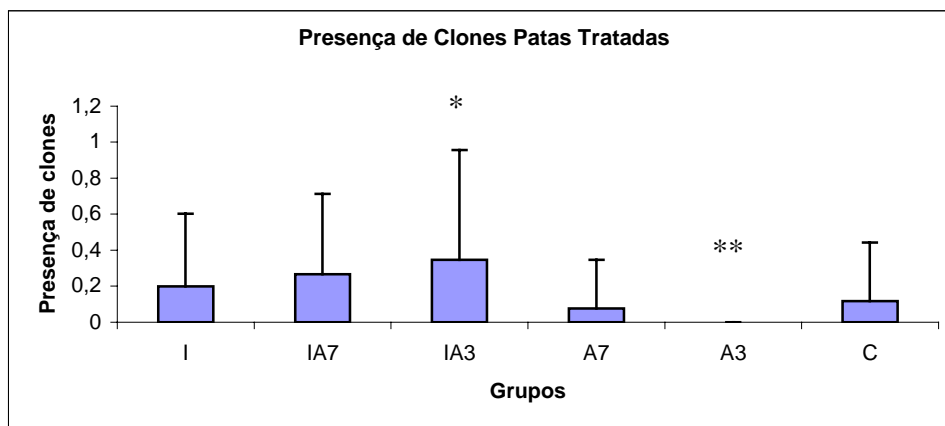


Figura 2: Média e desvios padrão da presença de clones. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA3 > A7 ($p=0,003$), A3 ($p=0,00$) e C ($p=0,01$). ** A3 < I ($p=0,04$), IA7 ($p=0,004$), IA3 ($p=0,00$). Não foi encontrada diferença entre os demais grupos.

Proteoglicanas

Com relação às proteoglicanas, o grupo imobilizado e alongado diariamente (IA7) apresentou uma maior perda em relação aos grupos IA3 ($p=0,00$), A7 ($p=0,00$), A3 ($p=0,00$) e C ($p=0,00$), como pode ser visualizado na Figura 3. O grupo imobilizado (I) também perdeu mais proteoglicanas que os demais, IA3 ($p=0,00$), A7 ($p=0,00$), A3 ($p=0,00$) e C ($p=0,00$), também visualizado na Figura 3.

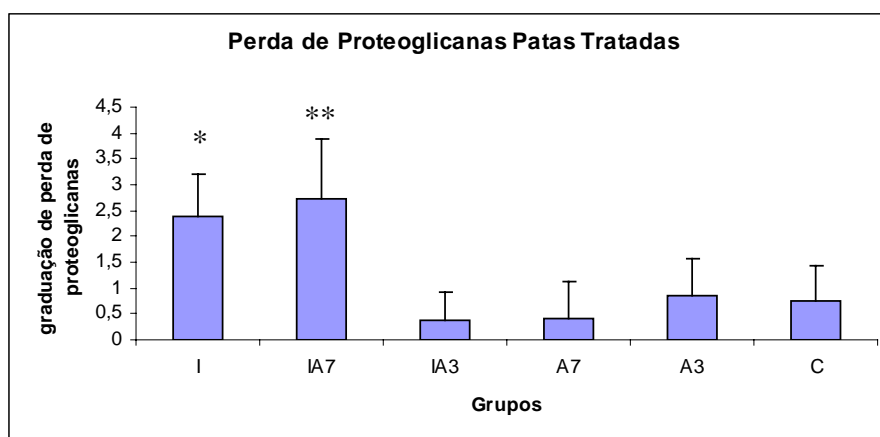


Figura 3: Média e desvios padrão da perda de proteoglicanas. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados

7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * I > IA3 ($p=0,00$), A7 ($0,00$), A3 ($p=0,00$) e C ($p=0,00$). ** IA7 > IA3 ($p=0,00$), A7 ($0,00$), A3 ($p=0,00$) e C ($0,00$).

A Figura 4 ilustra os diferentes padrões de coloração avermelhada da Safranina-O, encontrada nos grupos estudados. Na Figura 4A pode ser observada uma coloração avermelhada considerada normal. A Figura 4B representa um corte com perda leve de proteoglicanas, definido por uma redução parcial do avermelhado da Safranina-O. A Figura 4C ilustra uma perda importante do tom avermelhado e portanto, redução intensa de proteoglicanas.

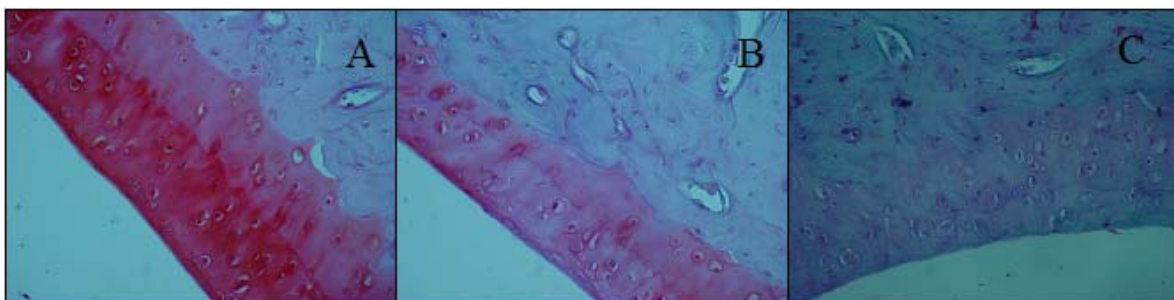


Figura 4: Painel montado a partir das fotomicrografias apresentando as diferentes graduações da ortocromasia para safranina-o fast green, indicando perda de proteoglicanas, encontradas nos grupos estudados. A: coloração avermelhada caracterizada como normal (graduação 0); B: redução leve da coloração avermelhada do corte (graduação 1 quando em até metade da área total do corte e 2 quando na extensão total do corte) e C: redução intensa da coloração avermelhada (graduação 3 quando em metade da área total do corte e 4 quando na extensão total do corte). Aumento de 400x.

Fibrilas de Colágeno

Com relação às fibrilas de colágeno, foi observado que a imobilização (I) e a imobilização seguida de alongamento diário (IA7) geraram redução e ou rearranjo das fibrilas finas em relação aos grupos IA3 ($p= 0,00$ e $p=0,00$), A7 ($p= 0,00$ e $p=0,00$) e C ($p= 0,00$ e $p=0,00$), respectivamente. Os dados estão representados na Figura 5.

Já com relação às fibrilas grossas, houve diminuição e ou rearranjo das mesmas em todos os grupos em relação ao grupo controle (C). O grupo controle só não apresentou diferença com relação ao grupo imobilizado. As diferenças entre o grupo controle e os demais foram: IA7 ($p= 0,01$), IA3 ($p= 0,00$), A7 ($0,00$), A3 ($p=0,001$). Também representados na Figura 5.

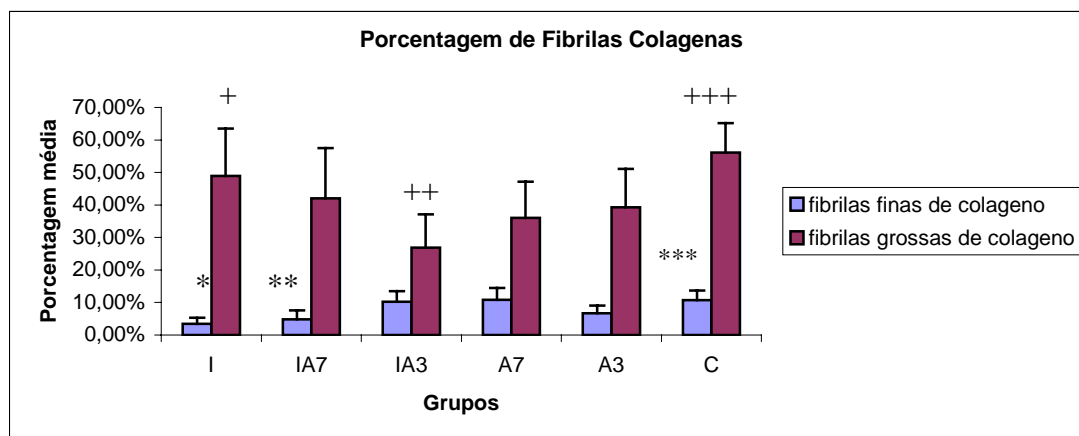


Figura 5: Apresentação das porcentagens de fibras colágenas finas e grossas observadas nas patas tratadas dos diferentes grupos. I= imobilizados, IA7= imobilizados e alongados 7x/sem, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A7= alongados 7x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. Fibras finas: * I < IA7 ($p= 0,00$), IA3 ($p= 0,00$), A7 ($p=0,00$), A3 ($p= 0,00$) e C ($0,00$); ** IA7 < IA3 ($p= 0,00$), A7 ($p= 0,00$) e C ($p= 0,00$); C*** > I ($p= 0,00$), IA7 ($p= 0,00$), A3 ($p= 0,001$). Fibras grossas: + I > IA3 ($p=0,00$), A7 ($p= 0,009$); ++ IA3 < I ($p= 0,00$), IA7 ($0,008$), C ($p= 0,00$); +++ C > IA7 ($p= 0,01$), IA3 ($p= 0,00$), A7 ($0,00$), A3 ($p=0,001$).

Na Figura 6 podem ser visualizados diferentes padrões de coloração presentes nas articulações talocrurais dos diferentes grupos estudados. Estes foram corados com picrossirius red e observados sob luz polarizada. Nas diferentes fotomicrografias, podemos observar colorações laranja/avermelhadas (setas), que indicam a presença de fibrilas colágenas grossas e mais fortemente agregadas, bem como, podemos visualizar colorações esverdeadas (cabeças de seta) que indicam fibrilas colágenas finas e com fraco estado de agregação. Em A observamos uma redução dos tons esverdeados e um aumento do tom alaranjado (seta). Esta fotomicrografia pertence a um animal do grupo imobilizado e seu padrão de coloração nos indica uma maior proporção de fibrilas grossas de colágeno. Na figura B observamos novamente um predomínio da coloração alaranjada com redução da coloração esverdeada (seta). Essa fotomicrografia pertence a um animal do grupo IA7 e indica uma redução das fibrilas finas de colágeno com concomitante aumento das fibrilas grossas. A figura C apresenta redução da coloração alaranjada seguida de aumento da proporção de coloração esverdeada (cabeça de seta). Esta imagem pertence a um animal do grupo IA3, e indica um aumento das fibrilas colágenas finas. Na figura D encontramos um predomínio da coloração alaranjada (seta), mas também pode ser visualizada a coloração esverdeada (cabeça de seta). Esta imagem pertence a um animal do grupo A7. Na figura E, de um

animal do grupo A3, novamente observamos as colorações alaranjadas (seta) e esverdeadas (cabeça de seta). A figura F pertence a um animal do grupo C. Nesta podemos visualizar uma proporção normal da coloração alaranjada (seta) e da coloração esverdeada (cabeça de seta), onde há o predomínio dos tons alaranjados.

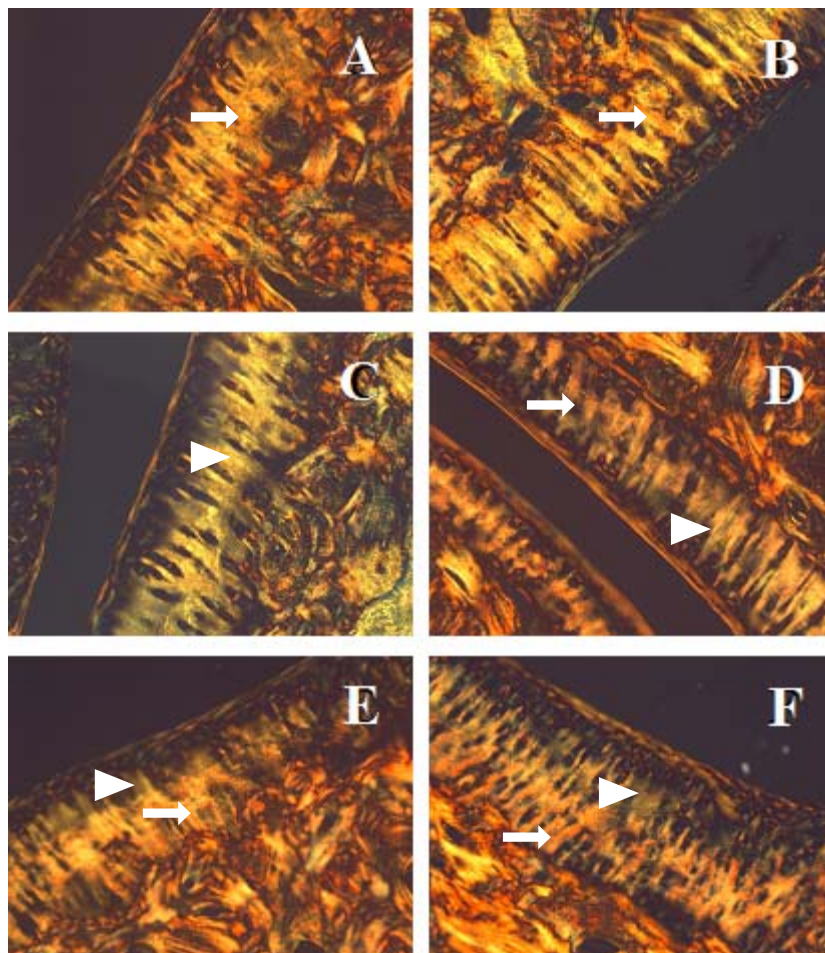


Figura 6: Fotomicrografias de cortes histológicos das articulações talo crurais dos animais dos diferentes grupos estudados. Todas foram coradas com picrossírius red e visualizadas sob luz polarizada. Os tons laranja avermelhados representam as fibrilas grossas de colágeno e os tons esverdeados, as fibrilas finas. A: um animal do grupo I apresentando predominantemente coloração laranja/avermelhada (seta), há redução da proporção da coloração esverdeada. B: animal do grupo IA7 com predomínio da coloração alaranjada (seta). C: animal do grupo IA3, com redução da coloração alaranjada e aumento da proporção de coloração esverdeada (cabeça de seta). D: animal do grupo A7, com coloração alaranjada (seta) e coloração esverdeada (cabeça de seta). E: animal do grupo A3, coloração alaranjada (seta) e coloração esverdeada (cabeça de seta). F: animal do grupo C, proporção normal da coloração alaranjada (seta) e coloração esverdeada (cabeça de seta). Aumento de 400X.

4.1.6. DISCUSSÃO

A imobilização articular prolongada gera alterações atróficas na cartilagem articular¹⁵. De uma forma geral, as alterações da cartilagem mais comumente encontradas em diferentes estudos, como resposta à imobilização articular, são a diminuição na espessura⁸, o amaciamento da cartilagem¹⁰, a diminuição do conteúdo de proteoglicanas^{13,14} e a redução das ligações cruzadas do colágeno^{13,14}. Estas são respostas diferentes das observadas frente a um trauma ou ao processo de instalação e evolução da osteoartrite.

No trauma, segundo o relatório de avaliação histológica de reparo da cartilagem articular, elaborado pela sociedade internacional de reparo em cartilagem (ICRS), a cartilagem articular, assim como outros tecidos, segue uma seqüência definida de eventos como reação à lesão. São eles: aumento do conteúdo de água, degradação da matriz por enzimas endógenas, apoptose e necrose celular, seguida por ruptura da matriz extracelular com perda de seus constituintes no espaço articular. Esse último serve como gatilho de resposta inflamatória na sinóvia. Assim, o processo de reparo é iniciado, envolvendo atividades limitadas de replicação celular, síntese aumentada de matriz extracelular e uma reorganização da matriz por células endógenas¹⁷.

Além do prejuízo da cartilagem que é observado na imobilização, há também a redução da amplitude de movimento². Esta é influenciada por um componente mio gênico, que é o encurtamento muscular nas semanas iniciais de imobilização¹. Portanto, o alongamento muscular é um recurso terapêutico bastante indicado e utilizado na reabilitação após protocolos de imobilização articular. Entretanto, segundo Brandt¹⁵, podem ocorrer danos irreversíveis na cartilagem articular previamente imobilizada, devido a cargas que quando aplicadas em articulações normais não produziram alterações morfológicas, bioquímicas ou metabólicas, levando a condropatias. Ele afirma que deve haver cautela na aplicação de cargas excessivas em uma cartilagem articular atrófica antes das proteoglicanas terem sido repostas. É interessante lembrar que em nosso estudo, as maiores alterações foram observadas no grupo imobilizado e alongado diariamente, ou seja, em um modelo de compressão gerado em uma cartilagem articular atrófica.

De acordo com a literatura, a birrefringência das moléculas colágenas, quando corada com picrossírius e vista através de microscópio de luz polarizada, é influenciada pela sua espessura e por seu estado de agregação física. As moléculas mais

fortemente agregadas, bem alinhadas e de maior espessura apresentam uma maior birrefringência^{18,19,20}. Segundo Montes²⁰, o colágeno tipo I forma fibras de maior espessura e fortemente agregadas, identificadas por meio de fibrilas grossas quando coradas por picrossírius. Essas características geram uma maior birrefringência e podem ser visualizadas através de luz polarizada. Já o colágeno tipo II, composto por finas fibrilas dispostas como uma rede, apresenta fraca birrefringência em função desse tipo de agregação.

No presente estudo não houve aumento de birrefringência das fibras grossas nos grupos submetidos às intervenções propostas. Isso pode indicar que não houve produção de colágeno tipo I frente às diferentes intervenções. Esse é um resultado positivo, pois sabe-se que o colágeno tipo I não é típico da cartilagem, mas ele está presente nas fases iniciais da osteoartrite²¹. Pelo contrário, com relação às fibras grossas, houve diminuição de sua proporção, detectada pelo software utilizado. Essa redução encontrada pode indicar uma desorganização ou redução das agregações das fibrilas grossas. Os grupos que apresentaram essa redução foram todos os submetidos ao alongamento com ou sem imobilização prévia (IA7, IA3, A7 e A3). Esse resultado pode indicar uma influência do estímulo mecânico na alteração e ou desorganização das fibrilas mais grossas de colágeno.

Em um estudo experimental, Hyttinen et al (2001) submeteram porcos da Índia jovens e idosos a exercícios em esteira e observaram que nos animais jovens, houve aumento da organização ou quantidade de colágeno, enquanto que o mesmo exercício provocou grande redução da organização ou quantidade de colágeno nos animais idosos. Assim como em nosso estudo, esses resultados demonstraram uma influência de força mecânica na organização/síntese-degradação do colágeno. Ainda com relação às fibras grossas do colágeno, observamos que a imobilização, como um fator isolado, não provocou resposta na agregação das fibrilas colágenas grossas. A ausência de compressão que ocorreu na imobilização, influenciou apenas na redução ou desorganização das fibrilas finas de colágeno. Essa alteração das fibrilas finas foi perpetuada no grupo imobilizado e alongado diariamente, o que não ocorreu no grupo submetido ao alongamento em dias alternados. Portanto, considerando a resposta colágena como um todo, houve um maior prejuízo desse componente frente à imobilização seguida de alongamento muscular diário.

A resistência da cartilagem às compressões a que ela é submetida nas atividades de vida diária se dá, entre outros fatores, em função do funcionamento adequado de dois de seus componentes. São eles: as proteoglicanas, responsáveis pela elasticidade e resiliência da cartilagem, e o colágeno que propicia uma rigidez tênsil e força ao tecido²². Quando avaliamos a resposta das proteoglicanas às intervenções, encontramos uma redução de seu conteúdo nos animais imobilizados e uma maior redução nos animais imobilizados e alongados diariamente. Entretanto, o grupo que recebeu alongamento em dias alternados não apresentou redução de seu conteúdo. O que mais uma vez, demonstra que essa frequência de intervenção pode ser menos lesiva ao tecido.

No estudo de Hyttinen et al (2001), anteriormente citado, também não foram encontradas alterações significativas no conteúdo de glicosaminoglicanas nos dois modelos de intervenção, apesar das alterações geradas no colágeno¹⁶. Essas alterações, que ocorreram no colágeno sem alteração da proteoglicana, podem indicar uma certa independência entre a resposta colágena e a resposta da proteoglicana frente a esses tipos de sobrecarga.

Resultados importantes, que podem estar relacionados com resposta de reparo frente às intervenções de nosso estudo, foram as respostas celulares encontradas. Houve formação de clones no grupo imobilizado e alongado em dias alternados, e aumento da celularidade no grupo imobilizado e alongado diariamente. Diferentes escores de avaliação histológica da cartilagem articular apresentam esse tipo de alteração celular como parte do processo de reparo^{17,23}. As alterações celulares têm relação direta com as respostas de reparo e manutenção da cartilagem, uma vez que é o condrócito que produz e mantém em equilíbrio os componentes da matriz. Mankin et al (1971) já descrevem em seu modelo de avaliação da cartilagem, alterações do condrócito como formação de clone, e alterações na celularidade como parte do processo de lesão e reparo da cartilagem²³.

4.1.7. CONCLUSÃO

O protocolo de alongamento muscular após imobilização realizado nesse estudo foi prejudicial à cartilagem articular, já que houve alteração celular, perda de proteoglicanas e redução das fibrilas finas e grossas de colágeno. Entretanto, sua

intervenção em dias alternados foi menos lesiva, tendo em vista a manutenção das proteoglicanas e das fibras finas de colágeno.

4.1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Trudel G, Uthoff HK. 2000. Contractures Secondary to Immobility: Is the Restriction Articular or Muscular? An Experimental Longitudinal Study in the Rat Knee. *Arch Phys Med Rehabil* 81: 6-13.
2. Trudel G, Zhou J, Uthoff HK et al. 2008. Four weeks of mobility after 8 weeks of immobility fails to restore normal motion: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 466: 1239–1244.
3. Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa S. 2006. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 14:196-202.
4. Shirazi R, Shirazi-Adl A, Hurtig M. 2008. Role of cartilage collagen fibrils networks in knee joint biomechanics under compression. *J Biomech* 41:3340-8.
5. Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS et al. 2003. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J Orthop Res* 21:110-16.
6. Eckstein F, Hudelmaier M, Putz R. 2006. The effects of exercise on human articular cartilage. *J Anat* 208:491-512.
7. Arokoski JPA, Jurvelin JS, Väättäinen U et al. 2000. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10:186-98.
8. Carter DR, Beaupre' GS, Wong M, et al. 2004. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop* 427s:69-77.
9. Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, et al. 1999. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7:59-70.
10. Narmoreva DA, Cheung H, Wang JY, et al. 2002. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model. *J Orthop Res* 20:83-91.

- 11 Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Saijo Y, et al. 2009. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. *J Orthop Res* 27:236-242.
12. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. 2002. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concept and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 10:408-419.
- 13 LeRoux MA, Cheung H, Baú JL, et al. 2001. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 633-40.
- 14 Haapala J, Arokoski JPA, Hittinen MM, et al. 1999. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin ortop* 1:218-29.
- 15 Brandt KD. 2003. Response of Joint Structures to Inactivity and to Reloading After Immobilization. *Arthritis Rheum (Arthritis Care & Research)* 49:267–271.
- 16 Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, et al. 2002. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 11:1329-32
17. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al. 2003. Histological Assessment of Cartilage Repair A report by the histology endpoint committee of The International Cartilage Repair Society. *J Bone Joint Surg (Am)* 85:45-57.
- 18 Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. (1982). The Influence of Tissue Section Thickness on the Study of Collagen by the Picrosirius-Polarization Method. *Histochemistry* 74:153-156.
19. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, et al. 1989. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 93:27 29.
- 20 Montes GS. 1996. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems *Cell Biology International* 20:15–27.
21. Velosa APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. 2003. Collagen in osteoarthrotic cartilage. *Rev Bras Reumatol* 43:160-6.
22. Hyttinen MM, Arokoski JPA, Parkkinen JJ, et al. 2001. Age matters: collagen birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea-pigs but

decreased in older animals after identical physiological type of joint loading. *Osteoarthritis Cartilage* 9:694–701.

23 Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg (Am)* 53:523-37.

5. ESTUDO II

COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DA REMOBILIZAÇÃO E DO ALONGAMENTO MUSCULAR APÓS IMOBILIZAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DA FIBRONECTINA, SULFATO DE CONDROITINA NA CARTILAGEM ARTICULAR

Adriana Frias Renner, Fernando Augusto Vasilceac, Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa.

5.1.1. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a resposta da fibronectina e do sulfato de condroitina frente a um protocolo de imobilização seguido de remobilização e outro seguido de alongamento muscular aplicado em dias alternados. Materiais e métodos: foram utilizados 20 ratos Wistar machos, adultos jovens, pesando em média $280g \pm 25,4g$. Eles foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=5): remobilizado (R), imobilizado e alongado 3 dias por semana (IA3), alongado 3 dias por semana (A3), e controle (C). Os grupos R e IA3 foram submetidos a 4 semanas de imobilização (patas posteriores esquerdas). Após esse período, o grupo R permaneceu livre na gaiola por três semanas e o grupo IA3 foi submetido a 3 semanas de alongamento (3 vezes por semana). O grupo A3 permaneceu livre na gaiola por 4 semanas e, posteriormente, foi submetido a 3 semanas de alongamento, 3 vezes por semana. Os protocolos de alongamento muscular foram realizados sob anestesia. Os tornozelos esquerdos foram mantidos em flexão dorsal máxima, 10 séries de 60s, com intervalos de 30s de repouso entre eles. O grupo C permaneceu livre na gaiola durante as 7 semanas do experimento. Após esses procedimentos, os animais foram eutanasiados, os tornozelos esquerdos foram coletados, processados em parafina e incubados com anti fibronectina e anti sulfato de condroitina 4. As intensidades das reações foram avaliadas de forma semi-quantitativa por dois observadores, sem conhecimento prévio dos grupos, e descritas como: 0 (sem marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação positiva) e 3 (marcação intensa). Foram realizados: o teste não paramétrico de Kruscal Wallis com post hoc de Newmann Keuls e o teste de correlação de Spearman para fibronectina e sulfato de

condroitina. Resultados: o grupo imobilizado e alongado em dias alternados (IA3) apresentou significativamente maior expressão de fibronectina que os outros grupos. Não houve diferença na expressão de sulfato de condroitina 4 entre os diferentes grupos. Houve uma fraca correlação entre as respostas da fibronectina e do sulfato de condroitina 4 frente às diferentes intervenções. Conclusão: O alongamento aplicado após imobilização provocou uma resposta de lesão/reparo bastante inicial sem evoluir para perda de sulfato de condroitina 4. Já esta mesma resposta inicial de lesão/reparo não foi desencadeada com a remobilização pura. Além disso, o alongamento aplicado em tecido sadio não provocou sinais de respostas deletérias.

5.1.2. INTRODUÇÃO

A fibronectina é uma glicoproteína presente em pequena quantidade na matriz extracelular da cartilagem articular normal. Ela possui domínios funcionais distintos que podem se ligar a integrinas, heparina, fibrina e colágeno. Como resultado da atividade desses muitos domínios funcionais, esta glicoproteína está envolvida em uma grande quantidade de processos biológicos como a migração celular, reparo, angiogênese e diferenciação celular¹. Há múltiplas isoformas de fibronectina. Elas são produzidas na superfície celular e depositadas na matriz extracelular como fibrilas de fibronectina altamente insolúveis. Zack et al (2006) afirmaram que apesar da fibronectina ser um componente em menor quantidade na matriz da cartilagem articular normal, em culturas de fragmentos de cartilagem osteoartrítica, pode haver até 10 vezes mais fibronectina. Isso ocorre em função dos aumentos tanto na sua síntese, como em seu acúmulo. Ela pode ser proteolisada em fragmentos menores, por múltiplas enzimas, e essa fragmentação é vista na sinóvia e na cartilagem de sujeitos com OA. Para esses autores, essa glicoproteína poderia ser um biomarcador da artrite e estaria envolvida no início e progressão da doença artrítica¹.

Wolf et al (2003) realizaram estudo com o objetivo de investigar se diferentes frequências de cargas mecânicas cíclicas, aplicadas intermitentemente em fragmentos de cartilagem, alterariam a biosíntese e retenção da fibronectina. Eles concluíram que o efeito das diferentes frequências e tempos de compressão e descompressão de cargas intermitentes não pode ser descrito na forma de uma correlação. Entretanto, afirmam que tais formas de carga induziram alterações no metabolismo da fibronectina, similares aos observados na osteoartrite humana e animal².

No caminho inverso da fibronectina, que aumenta com o início da doença artrítica, o sulfato de condroitina, uma glicosaminoglicana, componente importante da matriz extracelular, tem sua depleção como evento patofisiológico precoce na mesma³. Apesar dessa perda ser um evento chave no processo osteoartrítico, estudos em modelos animais mostraram que a cartilagem em um processo degenerativo inicial, antes de ocorrerem fibrilações, apresenta uma resposta de reparo hipermetabólica com aumento na síntese e degradação desses componentes da matriz⁴.

O sulfato de condroitina colabora fortemente com a compressibilidade da cartilagem articular. Aproximadamente 100 cadeias de sulfato de condroitina e 100 cadeias de queratan sulfato (ambas glicosaminoglicanas) estão ligadas a uma proteína central formando uma molécula de proteoglicana (agrecan). Essas glicosaminoglicanas criam uma grande pressão osmótica que atrai a água ao tecido fazendo com que a rede colágena se expanda. As moléculas colágenas permanecem organizadas em uma rede fibrilar densa e se encontram embebidas em uma alta concentração de agregados dessas proteoglicanas. Portanto, a propriedade de compressibilidade da cartilagem articular resulta do equilíbrio entre a pressão osmótica de tumefação garantidos pelas proteoglicanas/glicosaminoglicanas, mas também, de uma força de tensão que é proporcionada pelas fibrilas colágenas. Isso faz com que a capacidade biomecânica de sustentação de carga da cartilagem articular dependa tanto da sua composição como da organização de sua matriz extracelular⁵.

A imobilização articular ainda é um recurso necessário e utilizado na prática clínica para disfunções do sistema músculo-esquelético. Já está bem descrito que tal recurso provoca redução da amplitude de movimento⁶ e alterações atróficas na cartilagem articular. Essa cartilagem atrófica, por sua vez, estará mais propensa a sofrer danos com determinadas cargas compressivas, que normalmente não seriam lesivas⁷. Todos os sinais mecânicos que a cartilagem articular recebe modulam alterações na atividade bioquímica e no comportamento do condrócito. A compressão da cartilagem resulta em alterações complexas nesse tecido incluindo as deformações da matriz e da célula, alterações da pressão hidrostática e osmótica e alteração do conteúdo de água da matriz⁸. As cargas mecânicas excessivas⁸ ou cargas mecânicas fisiológicas quando aplicadas em uma cartilagem atrófica⁷, podem influenciar de forma negativa e levar a um desequilíbrio entre as atividades anabólicas e catabólicas, resultando em depleção dos componentes da matriz⁸.

Após períodos de imobilização, alguns recursos terapêuticos utilizados para ganho de amplitude de movimento têm sido estudados. Diferentes aspectos do efeito do alongamento muscular⁹ e da remobilização¹⁰ na cartilagem já foram descritos. Entretanto, não foram encontrados estudos investigando a resposta da fibronectina e do sulfato de condroitina nessas intervenções.

Tendo em vista o envolvimento da fibronectina e das glicosaminoglicanas em estágios iniciais de lesão e reparo da cartilagem articular, o objetivo do presente estudo foi investigar suas respostas e correlações frente a um protocolo de imobilização seguido de remobilização e outro seguido de alongamento muscular, aplicado em dias alternados.

5.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais:

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, adultos jovens pesando em média 280g \pm 25,4g. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas, em biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob condições controladas de luz (ciclo 12:12h) e temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e acesso livre a água e ração peletizada. O estudo obteve aprovação do comitê de ética em pesquisa animal desta instituição (Protocolo CEEA: 15/20006).

Procedimentos Experimentais:

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5): remobilizado (R), imobilizado e alongado 3 dias por semana (IA3), alongado 3 dias por semana (A3), e controle (C).

Os grupos R e IA3 foram submetidos a 4 semanas de imobilização, em flexão plantar da articulação talocrural das suas patas posteriores esquerdas, com modelo previamente utilizado^{9,11}. Após a retirada do aparato de imobilização, o grupo R permaneceu livre na gaiola por três semanas, e o grupo IA3 foi submetido a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, 3 vezes por semana. O grupo A3 permaneceu livre na gaiola por 4 semanas e, posteriormente, foi submetido a 3 semanas de alongamento da musculatura posterior da pata traseira esquerda, 3 vezes por semana. Os protocolos de alongamento muscular foram realizados sob anestesia (ketamina, 95 mg/kg e xilazina 12 mg/kg). Os tornozelos eram mantidos em flexão

dorsal máxima, 10 séries de 60s, com intervalos de 30s de repouso entre eles. O grupo C permaneceu livre na gaiola durante as 7 semanas do experimento.

Processamento das Amostras

Ao final das sete semanas, os animais foram eutanasiados com overdose anestésica e seus tornozelos esquerdos foram coletados, fixados com formol tamponado (10%), descalcificados com ácido nítrico (7,5%) acrescido de glicerina e processados em parafina. Foram realizados cortes de 6 µm em microtomo, montados em lâminas tratadas com aminosilane e incubados com anticorpos anti-sulfato de condroitina 4 ou anti-fibronectina.

Imunohistoquímica

Anti-fibronectina

Os cortes foram hidratados em série decrescente de álcool, submetidos a digestão enzimática com protease (Sigma P6911) 0,025%, diluído em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente, lavados em PBS, para bloqueio da peroxidase endógena, incubados em solução aquosa de H₂O₂ 3% por 20 minutos, novamente lavados com PBS acrescido de Triton 0,5% por 10 minutos. Para bloqueio das ligações inespecíficas, foram incubados com BSA 0,5%, por 30 minutos, e incubados overnight a 4°C com anticorpo primário rabbit anti-fibronectin (Dako), em uma diluição de 1:100. O anticorpo secundário (PK 6200 Vector) foi aplicado na diluição de 1:200 por 1h em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados com avidina biotina 1:100 (PK 6200 Vector) por 30 minutos. Lavados em PBS e revelados com DAB solução cromógena (DAB, DAKO). Os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados e montados com meio de montagem Permount.

Anti-sulfato de condroitina 4

Os cortes foram hidratados em série decrescente de álcool, incubados com chondroitinase ABC (Sigma Chemical Co) 0.02 U/ mL em tampão Tris-acetato com pH 8 por 30 minutos, lavados em PBS, realizado bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ por 20 minutos, lavados em PBS e PBS com Triton 0,5% por 10 minutos. Na seqüência, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com soro normal 1:50 em PBS (kit ABC PK 6200), por 30 minutos. Depois, os cortes foram incubados com anticorpo primário mouse anti-chondroitin-4-sulphate (Chemicon) na diluição de 1:200,

overnight a 4°C. O anticorpo secundário (PK 6200 Vector) foi aplicado na diluição de 1:200 por 1h, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados com avidina biotina 1:100 (PK 6200 Vector), por 30 minutos. Lavados em PBS e revelados com DAB solução cromógena (DAB, DAKO). Os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados e montados com meio de montagem Permount.

As fotomicrografias das reações de imunohistoquímica foram adquiridas através de câmera acoplada ao microscópio Zeiss, com aumento de 400x. As intensidades das reações foram avaliadas de forma semiquantitativa por dois observadores, sem conhecimento prévio dos grupos, e descritas como: 0 (ausente), 1 (fracamente positiva), 2 (positiva) e 3 (fortemente positiva), baseadas no estudo de Ustunel et al¹². Foram avaliadas separadamente: as camadas calcificadas (limite do osso subcondral até a linha de crescimento) e não calcificadas (linha de crescimento até superfície articular).

5.1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os testes não paramétrico de Kruskal Wallis, com post hoc Newman Keuls, para a comparação da classificação semiquantitativa de fibronectina e sulfato de condroitina 4 entre os diferentes grupos. Para testar a correlação entre as respostas da fibronectina e sulfato de condroitina 4, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Em todos os testes o nível de significância foi de $p \leq 0,05$ e considerada forte correlação o $R \geq 0,8$.

5.1.5. RESULTADOS

Imunomarcação para Fibronectina

Foram observadas diferentes intensidades de marcação para fibronectina na cartilagem articular dos diferentes grupos estudados. Estas marcações podem ser traduzidas como maior ou menor expressão da mesma neste tecido. As fotomicrografias que ilustram esses achados podem ser visualizadas na Figura 7. Na Figura 7A, de um animal do grupo remobilizado, pode ser observada uma imunomarcação positiva na camada calcificada (seta), o que indica expressão da fibronectina. Já na camada não calcificada há uma marcação fracamente positiva (cabeça de seta), indicando fraca expressão da mesma. A Figura 7B, de um animal do grupo IA3, apresenta imunomarcação positiva na camada calcificada (seta), indicando expressão da

fibronectina. Na camada não calcificada, a marcação é fortemente positiva (cabeça de seta) e indica forte expressão desta glicoproteína. Na Figura 7C, de um animal do grupo A3, podemos observar uma marcação fracamente positiva na camada calcificada (seta) e na camada não calcificada (cabeça de seta), o que significa que ambas apresentaram fraca expressão da fibronectina. A Figura 7D também apresenta uma marcação fracamente positiva na camada calcificada (seta), assim como, na camada não calcificada (cabeça de seta). Esse resultado indica fraca expressão da fibronectina nas duas camadas, e a imagem pertence a um animal do grupo controle.

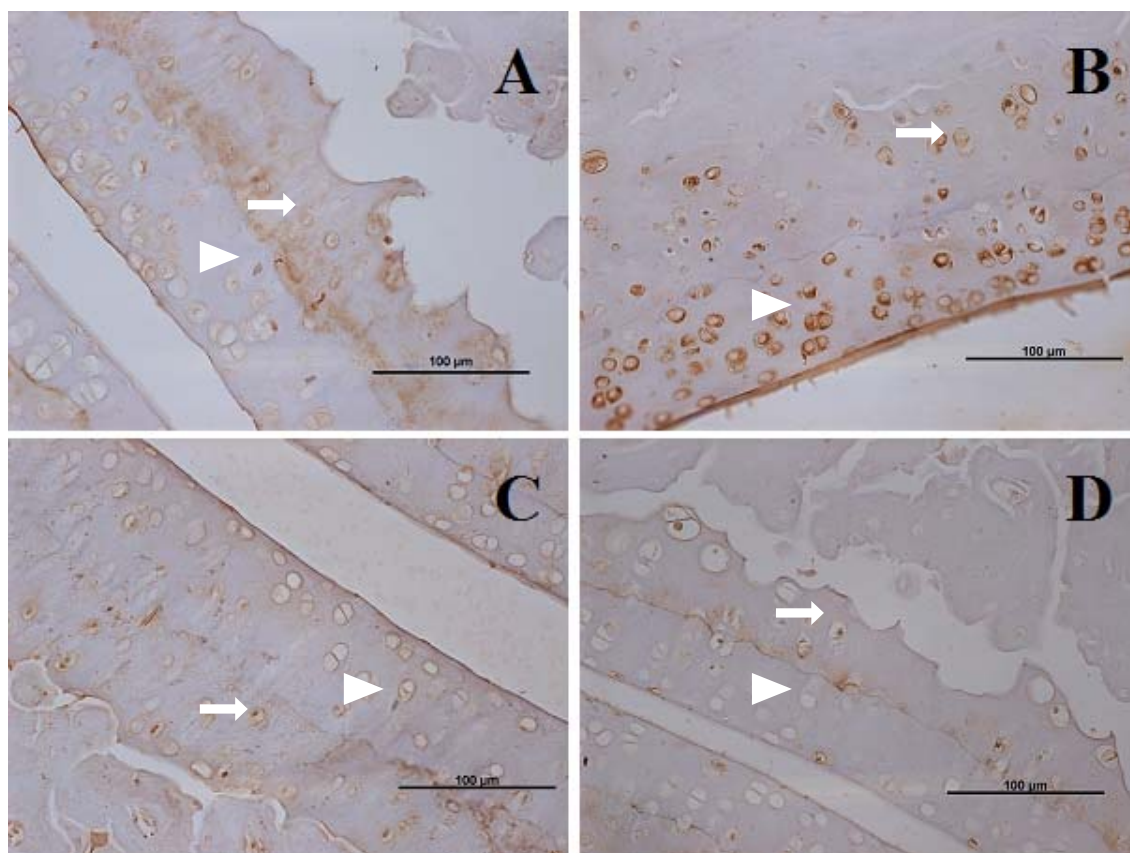


Figura 7: Fotomicrografia de reação de imunohistoquímica para fibronectina. A: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fracamente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo Remobilizado. B: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo IA3. C: marcação fracamente positiva na camada calcificada (seta) e na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo A3. D: marcação fracamente positiva na camada calcificada (seta) e também na camada não calcificada (cabeça de seta), grupo controle. Aumento de 400x.

Na camada calcificada, o grupo imobilizado e alongado em dias alternados (IA3) apresentou maior intensidade de marcação de fibronectina que os grupos A3

($p=0,03$) e C ($p=0,00$), como mostra a Figura 8. A maior intensidade de marcação está diretamente relacionada com uma maior expressão da fibronectina.

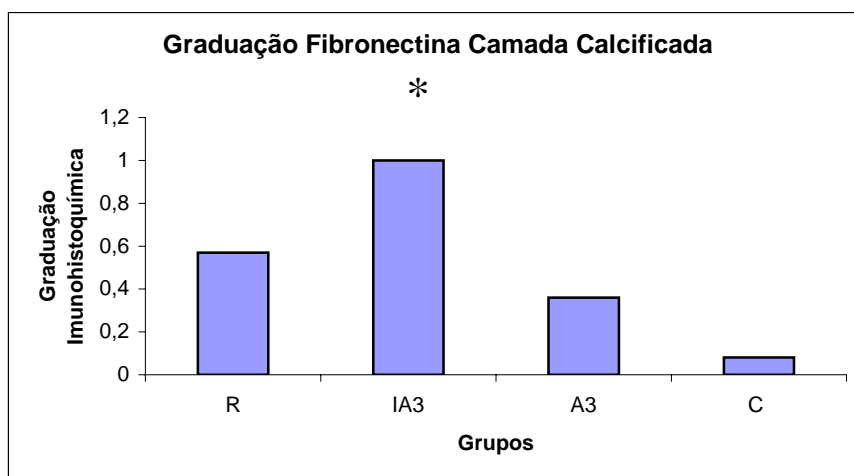


Figura 8: Média da gradação para fibronectina na camada calcificada. R= remobilizados, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA3 > A3 ($p=0,03$), e C ($p=0,00$).

Na camada não calcificada, o grupo imobilizado e alongado em dias alternados (IA3) apresentou maior intensidade de marcação que os grupos remobilizado (R) ($p=0,00$), alongado em dias alternados ($p=0,00$) e controle ($p=0,00$), ilustrado na Figura 9. Portanto, o grupo IA3 apresentou uma maior expressão de fibronectina que os demais grupos estudados.

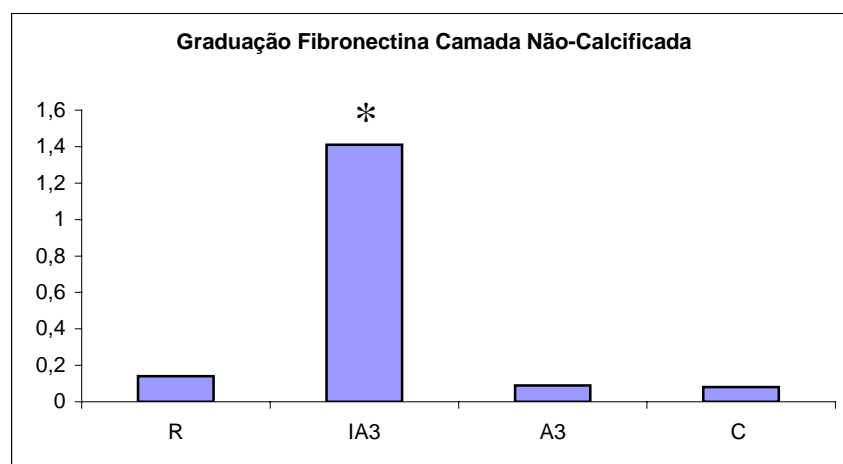


Figura 9: Média da gradação para fibronectina na camada não calcificada. R= remobilizados, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. * IA3 > R ($p=0,00$), A3 ($p=0,00$), e C ($p=0,00$).

Imunomarcção para sulfato de condroitina 4

Os condrócitos não apresentaram diferença entre as intensidades de imunomarcções para sulfato de condroitina nos diferentes grupos estudados. Isso significa que houve uma expressão semelhante dessa glicosaminoglicana nas diferentes intervenções aplicadas. As imagens podem ser vistas na Figura 10. Pode ser identificada na Figura 10A, uma imunomarcção positiva nos condrócitos da camada calcificada (seta) e uma marcação fortemente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), fotomicrografia de um animal do grupo remobilizado. Na Figura 10B, pode ser observada uma imunomarcção semelhante: positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), de um animal do grupo IA3. O mesmo ocorre com os condrócitos da Figura 10C: marcação positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na camada não calcificada (cabeça de seta), ela pertence a um animal do grupo C.

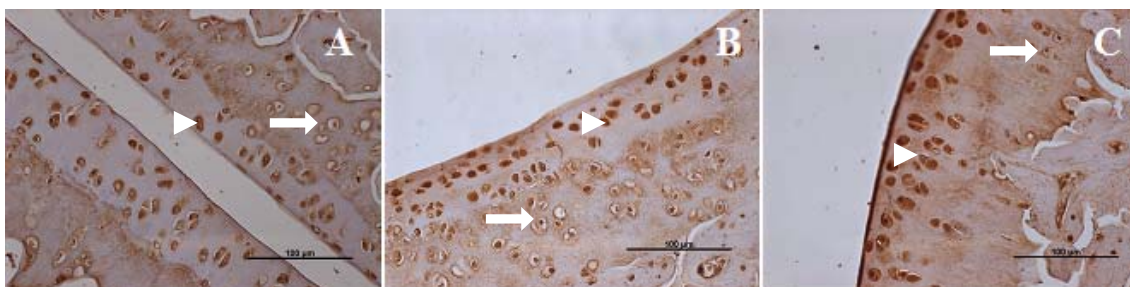


Figura 10: fotomicrografia da reação imunohistoquímica para sulfato de condroitina 4. Em A: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na não calcificada (cabeça de seta) de um animal do grupo remobilizado. Em B: imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na não calcificada (cabeça de seta) de um animal do grupo IA3. Em C imunomarcção positiva na camada calcificada (seta) e fortemente positiva na não calcificada (cabeça de seta) de um animal do grupo controle.

Aumento de 400x

Na Figura 11 pode ser visualizado que não houve diferença de marcação dos condrócitos para sulfato de condroitina entre os diferentes grupos estudados. Esse resultado, que significa uma expressão semelhante entre os condrócitos foi observado tanto na camada calcificada, como na camada não calcificada.

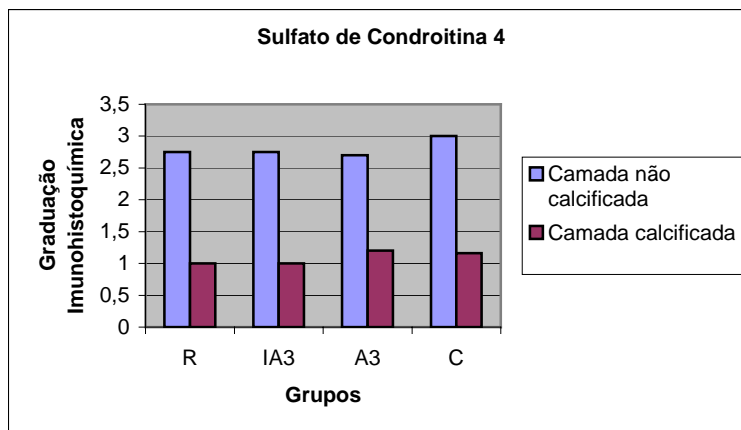


Figura 11: Média das graduações para sulfato de condroitina 4 nas camadas não calcificadas e camadas calcificadas. R= remobilizados, IA3 =imobilizados e alongados 3x/sem, A3= alongados 3x/sem, C=controle. Não houve diferença estatística nas comparações entre os diferentes grupos.

Na camada não calcificada foi encontrada fraca correlação entre as respostas da fibronectina e do sulfato de condroitina 4 ($R=0,03$), nos diferentes grupos todos com $p < 0,05$.

Uma fraca correlação também foi observada na camada calcificada com relação às respostas da fibronectina e sulfato de condroitina 4 ($R= - 0,19$) nos diferentes grupos, todos com $p < 0,05$.

5.1.6. DISCUSSÃO

Em nossos resultados pudemos observar um aumento significativo de fibronectina no grupo imobilizado e posteriormente alongado, tanto na camada calcificada como na não calcificada quando realizamos comparações com os demais grupos.

Brandt (2003) descreve que a cartilagem articular previamente imobilizada se torna atrófica e que, por isso, estímulos que não seriam lesivos em uma cartilagem articular normal, podem provocar lesões em uma cartilagem nessa condição⁷. Essa hipótese se confirma quando observamos que o mesmo protocolo de alongamento muscular, que provocou aumento de fibronectina no grupo previamente imobilizado (IA3), não provocou aumento de expressão da mesma quando aplicado na cartilagem articular sadia (grupo somente alongado). Isso demonstra que esse protocolo não é um estímulo prejudicial para um tecido normal.

O grande problema do acúmulo da fibronectina é que, além de ser um biomarcador da doença artrítica¹, está envolvido com efeitos deletérios no tecido. Diversos estudos buscaram identificar qual a influência dessa produção aumentada e desse acúmulo de fibronectina. Segundo Chevalier (1993), em estudo de revisão, um conteúdo aumentado de fibronectina durante os processos osteoartíticos pode implicar em conseqüências relacionadas às múltiplas funções da fibronectina e de seus fragmentos como a alteração do fenótipo do condrócito, mudança no tipo de colágeno sintetizado, atividade aumentada das metaloproteases no local e uma indução de atividades auto proteolíticas contra gelatina e fibronectina¹⁶. Zack et al (2006) relataram que já foi demonstrado que os fragmentos da fibronectina induzem metaloproteases incluindo MMP3, MMP13, agreganases e serino proteases. Essas proteases têm a habilidade de quebrar a maioria dos componentes da matriz da cartilagem, incluindo o colágeno tipo II e agregan, que são marcas da OA¹. Já Guo et al (2009) demonstraram que os produtos de degradação da fibronectina e seus fragmentos, gerados pelo dano a matriz, regulam o metabolismo do condrócito, já que expressam muitas propriedades esperadas no remodelamento ou em dano extenso da cartilagem. A exposição prolongada da cartilagem a altas concentrações de fragmentos de fibronectina pode suprimir a síntese de matriz e assim, limitar a resposta anabólica da cartilagem para o reparo da lesão¹³.

Tendo em vista o prejuízo causado pelo acúmulo de fibronectina, podemos considerar que o grupo remobilizado apresentou uma resposta favorável frente ao estímulo aplicado. Esse grupo permaneceu com seus níveis de fibronectina iguais ao grupo controle. Entretanto, para a prática clínica se torna inviável o uso de apenas a remobilização (livre movimentação) como proposta terapêutica após um período de imobilização. Segundo Trudel et al, a remobilização aplicada isoladamente não foi suficiente para recuperar a amplitude de movimento após período de imobilização¹⁴. Desta forma, ainda persiste a busca por estímulos mecânicos funcionais, que restabeleça a função articular, sem prejudicar a cartilagem articular.

A fibronectina é descrita na cartilagem como um colaborador na quebra da proteoglicana¹. Ayman et al (1996) afirmam que uma sobrecarga excessiva pode gerar redução do conteúdo de glicosaminoglicanas¹⁵. E, além disso, a redução da glicosaminoglicana é um achado precoce nas alterações cartilaginosas frente a estímulos lesivos³. Entretanto, em nosso estudo, apesar do aumento da síntese e acúmulo da

fibronectina no grupo imobilizado e alongado, não encontramos alteração concomitante do sulfato de condroitina neste grupo, e conseqüentemente, não houve correlação entre suas respostas frente aos protocolos aplicados. Uma possível explicação para esse resultado foi citada por Chevalier (1993). Ele descreve, em estudo de revisão, que o conteúdo de fibronectina já aumenta em uma cartilagem com alterações iniciais até mesmo antes das alterações nas glicosaminoglicanas serem detectadas¹⁶. Uma outra hipótese para esse resultado é que a fibronectina tenha sim estimulado quebra de proteoglicanas, mas essa quebra pode não ter sido detectada em função da resposta de reparo hipermetabólica dos condrócitos frente a estímulos lesivos precoces, como descrito por Hardingham (1998)⁴. Essa resposta de aumento na síntese dos componentes da matriz poderia manter inalterados os níveis de sulfato de condroitina frente a esse protocolo.

5.1.7. CONCLUSÃO

O alongamento aplicado após imobilização provocou uma resposta de lesão/reparo bastante precoce sem evoluir para perda de condroitin. Já esta mesma resposta precoce de lesão/reparo não foi desencadeada com a remobilização pura. Além disso, o alongamento aplicado em tecido sadio não provocou sinais de respostas deletérias.

5.1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zack MD, Arner EC, Anglin CP, et al. 2006. Identification of Fibronectin Neopeptides Present in Human Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis Rheum* 54: 2912–22.
2. Wolf A, Raiss RX, Steinmeyer J. 2003. Fibronectin metabolism of cartilage explants in response to the frequency of intermittent loading. *J Orthop Res* 21:1081–89.
3. Huang K, Wu LD. 2008. Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: a Review. *J Int Med Res* 36:1149 – 1160.
4. Hardingham 1998. Chondroitin sulfate and joint disease *Osteoarthritis Cartilage* 6s: 3-5.

5. Sauerland K, Plaas AHK, Raiss RX, et al. 2003. The sulfation pattern of chondroitin sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading. *Biochimica et Biophysica Acta* 1638:241–248.
6. Trudel G, Uthoff HK. 2000. Contractures Secondary to Immobility: Is the Restriction Articular or Muscular? An Experimental Longitudinal Study in the Rat Knee. *Arch Phys Med Rehabil* 81: 6-13.
7. Brandt KD. 2003. Response of Joint Structures to Inactivity and to Reloading After Immobilization. *Arthritis Rheum (Arthritis Care & Research)* 49:267–271.
8. Ramage L, Nuki G, Slater DM. 2009. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports* 19 :457-69.
9. Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa S. 2006. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:196-202.
10. Haapala J, Arokoski JPA, Hittinen MM, et al. 1999. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin ortop* 1:218-29.
11. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, et al. 2002. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 11:1329-32
12. Ustunel I, Sahin Z, Akkoyunlu G, et al. 2003. The Zonal Distributions of Alkaline Phosphatase, Adenosine Triphosphatase, Laminin, Fibronectin and Chondroitin 4-Sulphate in Growing Rat Humerus Proximal Epiphyseal Cartilage: a Histochemical and an Immunohistochemical Study. *Anat. Histol. Embryol* 32:356–361.
13. Guo D, Ding L, Homandberg GA. 2009. Telopeptides of type II collagen upregulate proteinases and damage cartilage but are less effective than highly active fibronectin fragments. *Inflamm Res* 58:161–169.

14. Trudel G, Zhou J, Uthoff HK et al. 2008. Four weeks of mobility after 8 weeks of immobility fails to restore normal motion: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 466: 1239–1244.
15. Ali AM, Sharawy M. 1996. Histochemical and Immunohistochemical Studies of the Effects of Experimental Anterior Disc Displacement on Sulfated Glycosaminoglycans, Hyaluronic Acid, and Link Protein of the Rabbit Craniomandibular Joint. *J Oral Maxillofac Surg* 54:992-1003.
16. Chevalier X. 1993. Fibronectin, Cartilage, and Osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 122: 307-318.

6. ANEXO I

**ARTIGO SUBMETIDO – ESTUDO I: MUSCLE STRETCHING AFTER
IMMOBILIZATION IS MORE BENEFICIAL TO ARTICULAR CARTILAGE
WHEN APPLIED ON ALTERNATE DAYS**

Adriana Frias Renner, Fernando Augusto Vasilceac, Carolina Kalil Dias, Anderson
Amaro dos Santos, Walcy Rosolia Teodoro, Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa

Submetido ao Journal of Orthopaedic Research



Muscle stretching after immobilization is more beneficial to articular cartilage when applied on alternate days

Journal:	<i>Journal of Orthopedic Research</i>
Manuscript ID:	JOR-10-0126
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	20-Feb-2010
Complete List of Authors:	Renner, Adriana; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Vasilceac, Fernando; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Santos, Anderson; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Dias, Carolina; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Teodoro, Walcy; Universidade de São Paulo, Rheumatology Mattiello-Rosa, Stela; Federal University of São Carlos, physical therapy
Keywords:	immobilization, muscle stretching exercises, articular cartilage



1
2
3 Muscle stretching after immobilization is more beneficial to articular cartilage when
4
5 applied on alternate days
6

7
8 Adriana Frias Renner, Fernando Augusto Vasilceac, Carolina Kalil Dias, Anderson Amaro
9
10 dos Santos, Walcy Rosolia Teodoro, Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa
11

12 13 14 15 Summary

16
17 Objective: To compare the response of articular cartilage after muscle stretching daily or on
18
19 alternate days after immobilization. Methods: A total of 36 animals divided into 6 groups:
20
21 immobilized (I), immobilized and stretched 7 days/week (IS7), immobilized and stretched 3
22
23 days/week (IS3), stretched 7 days/week (S7), stretched 3 days/week (S3) and control (C).
24
25

26
27 Groups I, IS7 and IS3 were immobilized for 4 weeks (left hind limb). After, IS7 and IS3
28
29 were subjected to 3 weeks of muscle stretching (same limb), daily or 3 times per week,
30
31 respectively. The S7 and S3 underwent a 3-week stretch (same limb) daily or 3 times per
32
33 week, respectively. Then, the ankles were removed and processed in paraffin and stained
34
35 with H&E, Safranin O and Picrossiruius Red. Two blind observers evaluated cellularity,
36
37 chondrocyte cloning, loss of proteoglycan and thin and thick fibril collagen content.
38
39

40
41 Results: The IS7 group showed a significant increase in cellularity when compared with
42
43 groups I and C. IA3 increased the chondrocyte cloning formation significantly compared
44
45 with the S7, S3 and C groups. Significant loss of proteoglycans presented the IS7 group
46
47 compared to all groups. IS7 significantly reduced the thin fibril content in relation to the
48
49 IS3, S7, S3 and C groups. Conclusion: The muscle stretching protocol applied after
50
51 immobilization was harmful to articular cartilage, as there was cellular alteration, loss of
52
53 proteoglycans and a reduction in thin and thick fibrils of collagen. However, the
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 intervention on alternate days was less harmful because of the maintenance of
4
5 proteoglycans and thin collagen fibers.
6
7

8 Introduction:

9
10 It is well known in rehabilitation practice that immobilization reduces the range of
11
12 motion. According to Trudel et al (2000) a reduced range of motion is caused by joint
13
14 contracture which occurs under the influence of joint (arthrogenic) and muscle structures
15
16 (myogenic). The influence of the arthrogenic component in joint contracture increases
17
18 linearly and continuously according to maintained immobilization. However, the authors
19
20 only describe hypotheses concerning which components could influence the arthrogenic
21
22 component of the joint restriction, such as the proliferation of connective tissue, collagen
23
24 changes and shortening of the joint capsule. Regarding the myogenic component, the
25
26 authors reported a greater influence of muscle structures only in the first weeks of
27
28 immobilization. After 16 to 32 weeks there was an arthrogenic predominance in limiting
29
30 the range of motion¹.
31
32
33
34
35

36 A recent study in an animal model, investigating joint contracture after
37
38 immobilization describes that after 8 weeks of immobilization there was no recovery of
39
40 range of motion when the only alternative therapy was remobilization. The authors discuss
41
42 that the presence of an incomplete reversibility of joint contractures demonstrates the need
43
44 for active treatment in the immobilized joints².
45
46
47

48 Based on the influence of the myogenic component of joint restriction after periods
49
50 of immobilization (muscle shortening), the muscle stretching protocols are options of
51
52 treatment in patients previously immobilized as this tissue would also be a restricting range
53
54 of motion. However it is important to remember that stretching muscle causes compression
55
56
57
58
59
60

1
2
3 in articular cartilage in different magnitudes by the mechanical load resulting from this
4
5 joint movement³
6
7

8 The influence of mechanical load on articular cartilage has been widely studied. It
9
10 influences the structure and organization of the extracellular matrix components of
11
12 cartilage. As the chondrocyte perceives its environment and these mechanical effects
13
14 through complex biological and biophysical interactions with the extracellular matrix, the
15
16 mechanical loads also ultimately influence the rates of synthesis / degradation of different
17
18 extracellular matrix components^{4,5,6,7, 8,9}.
19
20
21

22 Besides the studies of mechanical loads, many studies have also investigated the
23
24 changes in the cartilage caused by immobilization^{10, 11,12}. The results observed are decreases
25
26 in thickness⁶, cartilage softening^{10,11}, decreased content of proteoglycans^{13, 14, 11} and
27
28 reduction of collagen cross-linking^{13,14}. According to Brandt et al (2003) immobilization
29
30 produces atrophic changes in articular cartilage¹⁵.
31
32
33

34 A previous study from our group, investigated the response of a muscle stretching
35
36 protocol performed daily in animals previously immobilized³. According to our results,
37
38 muscle stretching applied daily after a period of immobilization was harmful to the articular
39
40 cartilage. Based on the results of our previous study, we consider that data as the frequency
41
42 and intervals between interventions *in vivo* still need further investigation.
43
44
45 Therefore, the aim of this study is to compare the response of a protocol applied daily to a
46
47 protocol applied on alternate days after a period of joint immobilization.
48
49
50

51 52 53 Methods

54 55 Groups:

56
57 Thirty six male Wistar rats, young adults at 16 weeks old and weighing 280g + 25.4 g were
58
59
60

1
2
3 used for this experiment. The animals were housed in plastic cages in an animal room under
4
5 controlled environment conditions of light and temperature and free access to water and
6
7 standard food. The study was approved by the ethics committee of animal research in this
8
9 institution (EAEC Protocol: 15/20006).
10
11

12 Experimental Procedures:

13
14 The animals were divided into 6 groups: immobilized (I), immobilized and stretched 7 days
15
16 a week (IS7), immobilized and stretched 3 days per week (IS3), stretched 7 days a week
17
18 (S7), stretched 3 days per week (S3) and control (C).
19
20

21
22 Groups I, IS7 and IS3 were submitted to 4 weeks of immobilization of their left hind limbs,
23
24 according to the model previously used^{3,16}. After removing the immobilization device, the
25
26 immobilized group (I) remained free in the cage for three weeks and the IS7 and IS3 groups
27
28 underwent 3 weeks of stretching of the posterior muscles of the left hind limb daily and 3
29
30 times per week, respectively. The S7 and S3 groups remained free in the cage for 4 weeks
31
32 and then underwent a 3-week stretch of the posterior muscles of the left hind limb daily or
33
34 3 times per week, respectively. The muscle stretching protocol was performed under
35
36 anesthesia, and consisted of maintaining the ankle held in dorsiflexion at a maximum 10
37
38 repetitions of 60 s with intervals of 30 seconds of rest between them. Group C remained
39
40 free in the cage during the 7 weeks of the experiment.
41
42
43
44

45 Preparation of the Samples

46
47 At the end of seven weeks, the animals were euthanized and their left ankles were
48
49 removed, fixed with buffered formaldehyde (10%), decalcified with nitric acid 7.5% and
50
51 glycerin (70ml / l of solution) and processed in paraffin. Cuts were made of 6 mm in a
52
53 micrometer (Leica) and mounted on slides treated with aminosilane. The samples were
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 stained with hematoxylin & eosin (H & E), Safranin O fast green and picrosirius red for
4
5 analysis.
6

7 8 Histologic Analysis: 9

10 Chondrocyte cloning was evaluated by two blind observers along the length of each
11 cut on the slides stained with H&E. Morphometric analysis of cellularity was also carried
12 out using this stain. Concerning the morphometric evaluation of cellularity, the Axiovision
13 4.7 (Carl Zeiss) image analysis software was used. A central area of the cut of 40,000 mm
14 was initially defined and the chondrocytes were subsequently counted³.
15
16

17 In sections stained with Safranin O, it was made the same classification of the previous
18 study³.
19
20
21

22 The sections stained with Sirius Red were evaluated using a polarized light
23 microscope using the Image Pro Plus software (Olympus). The collagen fibers stained with
24 Sirius Red (specific for detecting collagen) observed under a polarized light stain presents a
25 color that depends on the thickness of the fibers and their state of aggregation. With the
26 increase in thickness and physical aggregation, the color changes from green to yellow,
27 orange to red^{18, 19, 20}. Using the software, the images yellow / green were defined as thin
28 fibrils and the orange / red defined as thick fibrils. The areas identified by the software
29 corresponding to thin fibrils and thick collagen fibrils were then divided by the total area
30 examined and the final result was expressed as a percentage. The percentage of thin fibrils
31 and thick fibrils of the total area assessed for each group studied could be observed.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Statistical analysis 51

52 We used the nonparametric Kruskal Wallis test with post hoc Newman Keuls to
53 compare the classification of clones and the proteoglycan content between the different
54 groups. In terms of intergroup comparisons of morphometric evaluation of cellularity,
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Duncan's multiple comparison test was used. The evaluation of the proportion of thin and
4
5 thick fibrils of collagen in different groups was performed using ANOVA with the Tukey
6
7 post hoc test. In all tests, the level of significance was $p \leq 0.05$.
8
9

10 Results

11
12 There was no skin ulceration or edema in the legs after removing the immobilization
13
14 device. According to the macroscopic examination of the joints, there were no erosions,
15
16 osteophytes, surface irregularities or cracks in the different groups.
17
18

19
20 The cellularity of the articular cartilage of the immobilized and stretched daily
21
22 group (AC7) increased when compared to the immobilized group (I) ($p = 0.04$) and control
23
24 group (C) ($p = 0.04$). Figure 1.
25
26

27
28 The immobilized group which was stretched three days a week (IS3) also had a
29
30 significant chondrocyte cloning increase in relation to groups stretched daily (A7) ($p =$
31
32 0.003), stretched on alternate days (A3) ($p = 0.00$) and the control (C) ($p = 0.01$). Figure 2.
33
34

35
36 The greatest loss of proteoglycan was in the group immobilized and stretched daily
37
38 (IS7) (figure 4C) in relation to all the other groups IS3 ($p = 0.00$), I7 (0.00), I3 ($p = 0.00$)
39
40 and C ($0, 00$). The immobilized group (I) also lost more proteoglycan than the others
41
42 (figure 4B), IS3 ($p = 0.00$), S7 (0.00), S3 ($p = 0.00$) and C ($p = 0.00$). Figure 3.
43
44

45
46 With respect to collagen fibrils, it was observed that the immobilization (I) and
47
48 immobilization followed by daily stretching (IS7) produced a reduction and rearrangement
49
50 of thin fibrils in relation to groups IS3 ($p = 0.00$ and $p = 0.00$), S7 ($p = 0.00$ and $p = 0.00$)
51
52 and C ($p = 0.00$ and $p = 0.00$), respectively.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Regarding thick fibrils, there was a decrease and or rearrangement of them in all
4
5 groups compared to the control (C), with the exception of the immobilized group (I). As
6
7 such: IS7 ($p = 0.01$), IS3 ($p = 0.00$), S7 (0.00), S3 ($p = 0.001$).
8
9

10 Discussion

11
12 The prolonged joint immobilization produces atrophic changes in articular
13
14 cartilage¹⁵. In general, the most common changes of the cartilage in response to joint
15
16 immobilization described in different studies are decreases in thickness⁶, cartilage softening
17
18 ¹⁰, decreased content of proteoglycans^{13,14} and reduction of collagen cross-linking^{13,14}. These
19
20 are different responses from the observed ones in a trauma or process of installation and
21
22 development of osteoarthritis. According to the report of the histological evaluation of
23
24 repair of articular cartilage prepared by the International Cartilage Repair Society (ICRS),
25
26 joint cartilage, as well as other tissues, follows a defined sequence of events in response to
27
28 injury. It increases the water content, matrix degradation by endogenous enzymes,
29
30 apoptosis and cell necrosis, followed by disruption of the extracellular matrix with loss of
31
32 their constituents into the joint space. The latter serves as a trigger of inflammatory
33
34 response in synovium. Thus, the repair process is initiated. It involves limited activities of
35
36 cell replication, increased synthesis of extracellular matrix and a reorganization of matrix
37
38 by endogenous cells¹⁷.
39
40
41
42
43
44

45
46 In addition to tissue damage generated by immobilization, there is a decrease in the
47
48 range of motion². Considering that this joint restriction is also influenced by a myogenic
49
50 component, muscle shortening¹, muscle stretching is a therapeutic resource, which is
51
52 recommended and used in rehabilitation after joint immobilization protocols. However,
53
54 according to Brandt (2003) irreversible damage to the previously immobilized articular
55
56 cartilage can occur with loads that when applied to normal joints would not produce
57
58
59
60

1
2
3 morphological, biochemical, or metabolic disorders leading to condropathies. The author
4 says that one must be cautious when applying excessive loads to an atrophic articular
5 cartilage before proteoglycans are restored¹⁵.
6
7

8
9
10 Therefore, this study brings a compression model generated in an atrophic articular
11 cartilage. In our study, major changes were observed in the immobilized and stretched
12 every day group. According to the literature, the birefringence of collagen molecules when
13 stained with picosirius red and viewed through a polarized light microscope is influenced
14 by its thickness and its physical aggregation state. Molecules which were more strongly
15 aggregated, better aligned and thicker have a higher birefringence^{18, 19, 20}. According to
16 Montes²⁰ collagen type I, for example, forms thick and strong aggregated fibrils identified
17 through thick fibrils when stained by picosirius. These characteristics generate higher
18 birefringence and can be viewed through polarized light. Collagen type II consists of thin
19 fibrils and is arranged as a network and it has low birefringence due to this type of
20 aggregation. In our study, there was no increase in birefringence of thick fibrils in groups
21 submitted to the proposed interventions. This may indicate that there was no production of
22 collagen type I in the different interventions. This is a positive result, since it is known that
23 collagen type I is not typical of the cartilage, but it is present in the early stages of
24 osteoarthritis²¹. On the contrary, the thick fibers birefringence decreased their proportion
25 detected by the software. This reduction may indicate a disruption or reduction of
26 aggregations of thick fibrils. The groups that showed this reduction were all the groups
27 subjected to stretching with or without prior immobilization (IS7, IS3, S7 and S3). This
28 result may indicate a mechanical influence in the disorganization or disruption of the
29 thicker collagen fibrils.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In an experimental study, Hyttinen et al (2001) subjected young and old Guinea pigs
4 to exercise on a treadmill and found that in young animals there was an increasing
5 organization or quantity of collagen while the same exercise caused great reduction in the
6 amount or organization of collagen in the older animals²². As in our study, these results
7 demonstrate an influence of mechanical force in the organization / synthesis-degradation of
8 collagen. Regarding thick collagen fibrils, we observed that immobilization alone did not
9 result in an alteration of its aggregation response. The absence of compression that occurred
10 in immobilization only influenced the reduction or disruption of the thin collagen fibrils.
11 This alteration of thin fibrils was perpetuated in the immobilized group and stretched every
12 day (IS7). It did not occur in the immobilized and stretched on alternate days group (IS3).
13 Therefore, considering the collagen response, there was a greater loss of this component in
14 the immobilization followed by daily muscle stretching (IS7) compared with the
15 immobilized and stretched on alternate days group (IS3).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 The cartilage resistance to compression to which it is subjected in everyday
35 activities is given, among other factors, according to the proper functioning of two of its
36 components. They are proteoglycans which are responsible for elasticity and resilience of
37 cartilage and collagen which provides tensile stiffness and strength to the tissue¹⁵. When we
38 evaluated the proteoglycans response concerning the interventions, we found a reduction in
39 its content in the immobilized animals and a further reduction in animals immobilized and
40 stretched every day. However, the immobilized and stretched on alternate days group
41 showed no reduction in their content. This response once again demonstrates that this
42 frequency of intervention may be less harmful to the tissue. In the study conducted by
43 Hyttinen et al (2001), mentioned above, no significant changes in glycosaminoglycan
44 content in two models of intervention were found despite the changes generated in
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 collagen²². Collagen alterations without changing the proteoglycan content may indicate a
4
5 degree of independence between the response of collagen and proteoglycan against this
6
7 kind of overload.
8
9

10 The chondrocyte cloning formation in the immobilized and stretched on alternate
11 days group and the increased cellularity in the immobilized and stretched every day group
12 may be related to the repair response to our interventions. Different histological scores of
13 articular cartilage describe this type of cellular change as part of the repair process^{18,23}.
14
15 The cellular changes are directly related with the responses of repair and maintenance of
16 cartilage as it is the chondrocytes that produce and maintain balance in the matrix
17 components. Mankin et al (1971) already described chondrocyte cloning and cellular
18 changes as part of the lesion and cartilage repair in his assessment model²³. Regardless of
19 both groups presenting cellular responses, the immobilized and everyday stretched group
20 presented worse matrix results.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33
34 The muscle stretching protocol applied after immobilization in this study was
35 harmful to articular cartilage, as there was cellular alteration, loss of proteoglycans and a
36 reduction in thin and thick fibrils of collagen. However, the intervention on alternate days
37 was less harmful because of the maintenance of proteoglycans and thin collagen fibers.
38
39
40
41
42

43 Acknowledgements

44
45 The authors would like to acknowledge Ana Rocha, Department of Pathology,
46 University of Sao Paulo for her technical assistance, Professor
47 Jorge Oishi, Department of Biostatistics, Federal University
48 of Sao Carlos for his helpful advice regarding statistical methods. This study was supported
49
50
51
52
53 by grants from CNPq (141890/2006-1) and FAPESP (2006/04112-4).
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Trudel G, Uthoff HK. 2000. Contractures Secondary to Immobility: Is the Restriction Articular or Muscular? An Experimental Longitudinal Study in the Rat Knee. *Arch Phys Med Rehabil* 81: 6-13.
2. Trudel G, Zhou J, Uthoff HK et al. 2008. Four weeks of mobility after 8 weeks of immobility fails to restore normal motion: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 466: 1239–1244.
3. Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa S. 2006. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 14:196-202.
4. Shirazi R, Shirazi-Adl A, Hurtig M. 2008. Role of cartilage collagen fibrils networks in knee joint biomechanics under compression. *J Biomech* 41:3340-8.
5. Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS et al. 2003. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J Orthop Res* 21:110-16.
6. Eckstein F, Hudelmaier M, Putz R. 2006. The effects of exercise on human articular cartilage. *J Anat* 208:491-512.
7. Arokoski JPA, Jurvelin JS, Väättäinen U et al. 2000. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10:186-98.
8. Carter DR, Beaupre' GS, Wong M, et al. 2004. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop* 427s:69-77.
9. Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, et al. 1999. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7:59-70.

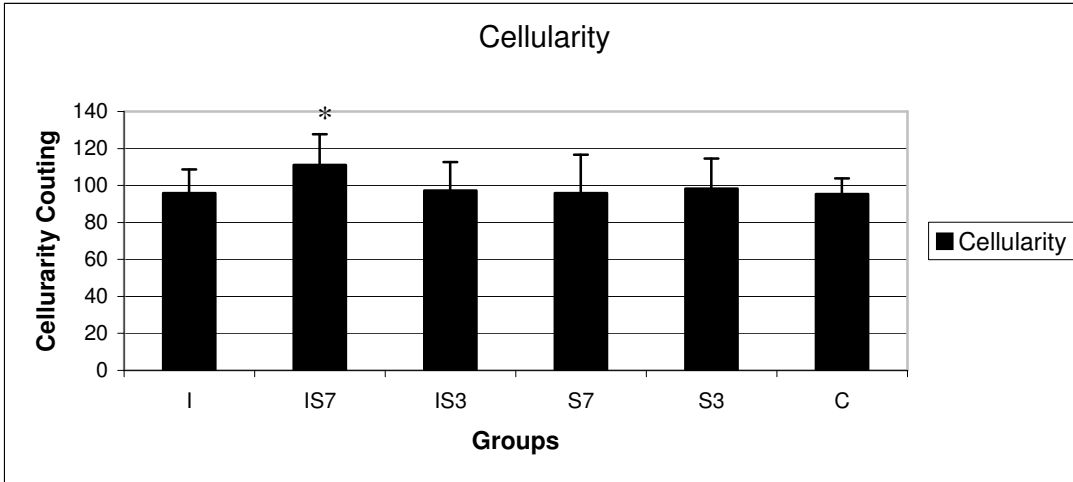
- 1
2
3 10 Narmoreva DA, Cheung H, Wang JY, et al. 2002. Altered swelling behavior of femoral
4 cartilage following joint immobilization in a canine model. *J Orthop Res* 20:83-91.
5
6
7
8 11 Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Saijo Y, et al. 2009. Changes of articular cartilage
9 after immobilization in a rat knee contracture model. *J Orthop Res* 27:236-242.
10
11
12 12. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. 2002. The effects of immobilization on the
13 characteristics of articular cartilage: current concept and future directions. *Osteoarthritis*
14 *Cartilage* 10:408-419.
15
16
17
18 13 LeRoux MA, Cheung H, Baú JL, et al. 2001. Altered mechanics and histomorphometry
19 of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 633-40.
20
21
22 14 Haapala J, Arokoski JPA, Hittinen MM, et al. 1999. Remobilization does not fully
23 restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin ortop* 1:218-29.
24
25
26
27 15 Brandt KD. 2003. Response of Joint Structures to Inactivity and to Reloading After
28 Immobilization. *Arthritis Rheum (Arthritis Care & Research)* 49:267-271.
29
30
31
32 16 Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, et al. 2002. A new model for the immobilization
33 of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 11:1329-32
34
35
36
37 17. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al. 2003. Histological Assessment of
38 Cartilage Repair A report by the histology endpoint committee of The International
39 Cartilage Repair Society. *J Bone Joint Surg (Am)* 85:45-57.
40
41
42
43 18 Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. (1982). The Influence of Tissue Section
44 Thickness on the Study of Collagen by the Picrosirius-Polarization Method. *Histochemistry*
45 74:153-156.
46
47
48
49 19. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, et al. 1989. Are the polarization colors of Picrosirius
50 red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 93:27
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 20 Montes GS. 1996. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems
4
5 Cell Biology International 20:15–27.
6

7
8 21. Velosa APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. 2003. Collagen in osteoarthrotic cartilage.
9
10 Rev Bras Reumatol 43:160-6.
11

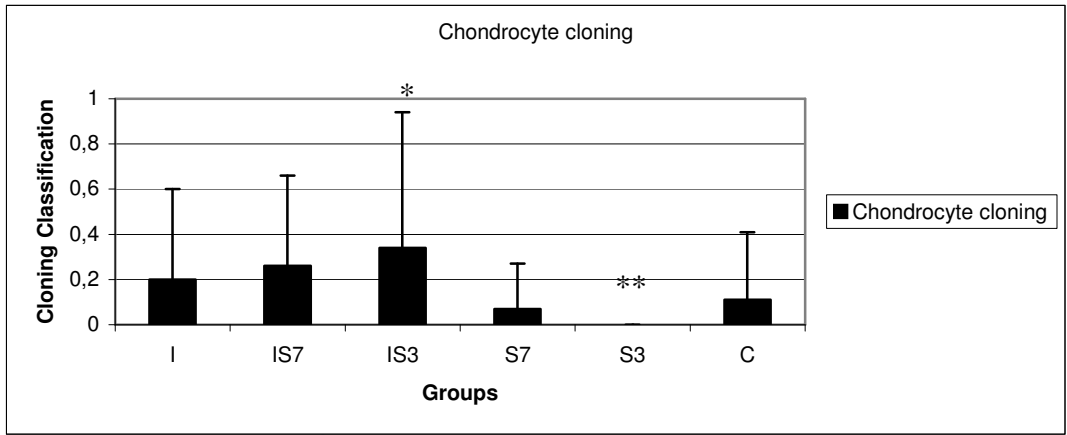
12 22. Hyttinen MM, Arokoski JPA, Parkkinen JJ, et al. 2001. Age matters: collagen
13
14 birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea-pigs but
15
16 decreased in older animals after identical physiological type of joint loading. Osteoarthritis
17
18 Cartilage 9:694–701.
19
20

21 23 Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. 1971. Biochemical and metabolic
22
23 abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of
24
25 morphology with biochemical and metabolic data. J Bone Joint Surg (Am) 53:523-37.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



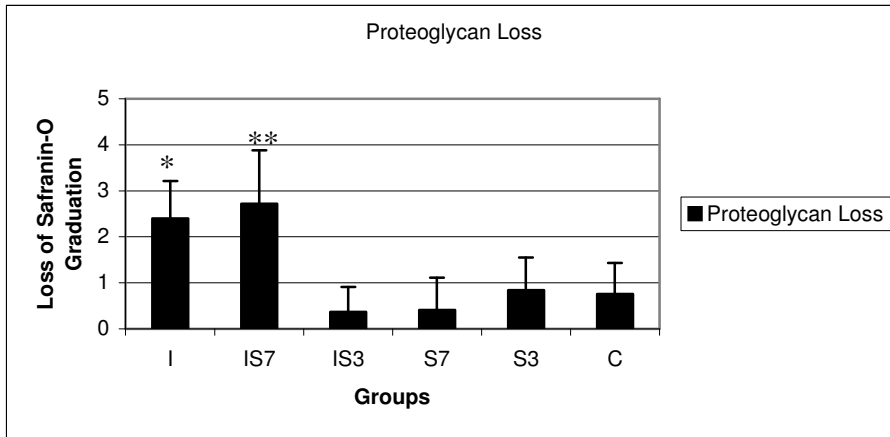
For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

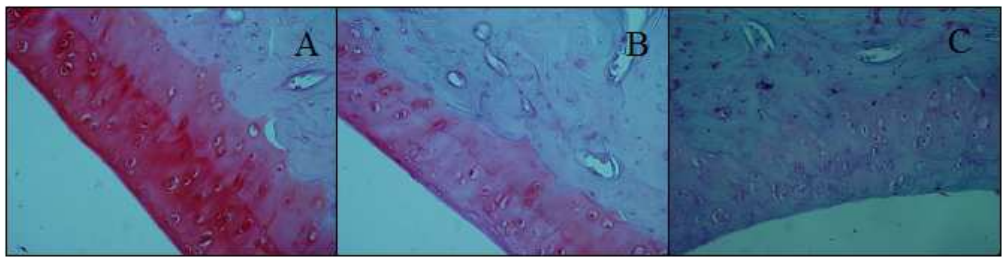


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

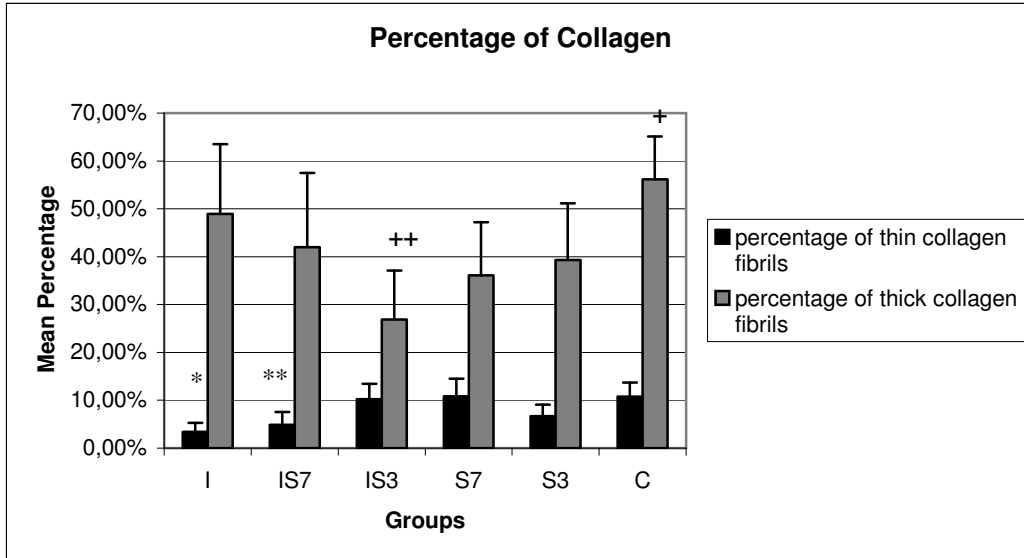


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

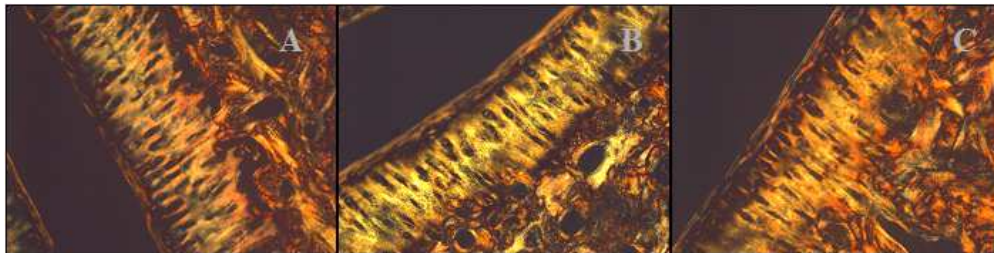


176x44mm (96 x 96 DPI)

For Peer Review



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



185x47mm (96 x 96 DPI)

For Peer Review

1
2
3 Figure 1: Mean cellularity. I = immobilized, IS7 = immobilized and stretched 7x/week , IS3
4 = immobilized and stretched 3x/week, S7= stretched 7x/week, S3 = stretched 3x/week, C =
5 control. * IS7> I (p = 0.04) and C (p = 0.04)
6
7

8 Figure 2: Mean of chondrocyte cloning of the treated hind limbs. I = immobilized, IS7 =
9 immobilized and stretched 7x/week, IS3 = immobilized and stretched 3x/week, S7 =
10 stretched 7x/week, S3 = stretched 3x/week, C = control. * IS3> S7 (p = 0.003), S3 (p =
11 0.00) and C (p = 0.01). ** S3 <I (p = 0.04), IS7 (P = 0.004), IS3 (p = 0.00).
12
13

14 Figure 3: Mean and standard deviation of the loss of proteoglycans . I = immobilized, IS7 =
15 immobilized and stretched 7x/week, IS3 = immobilized and stretched 3x/week, S7=
16 stretched 7x/week , S3 = stretched 3x/week, C = control. * I> IS3 (p = 0.00), S7 (0.00), S3
17 (p = 0.00) and C (p = 0.00). IS7 **> IS3 (p = 0.00), S7 (0.00), S3 (p = 0.00) and C (0.00).
18
19

20 Figure 4: Photomicrographs of tibial articular cartilage (Safranin-O staining). (A) normal
21 Safranin-O staining intensity, from control group, (B) slight reduction of matrix staining
22 intensity, treated hind limb from an I group rat, (C) severe reduction on Safranin-O
23 staining, treated hind limb from IS7 group rat (400x).
24
25

26 Figure 5: Mean and standard deviation of the thin and thick collagen fibrils. I =
27 immobilized, IS7 = immobilized and stretched 7x/week, IS3 = immobilized and stretched
28 3x/week, S7= stretched 7x/week , S3 = stretched 3x/week, C = control.
29

30 Thin fibrils: * I < IS7 (p= 0,00), IS3 (p= 0,00), S7 (p=0,00), S3 (p= 0,00) and C (0,00); **
31 IS7 < IA3 (p= 0,00), S7 (p= 0,00) and C (p= 0,00);

32 Thick fibrils: + C > IS7 (p= 0,01), IS3 (p= 0,00), S7 (0,00), S3 (p=0,001)I > IS3 (p=0,00),
33 S7 (p= 0,009); ++ IS3 < I (p= 0,00), IS7 (0,008), C (p= 0,00).
34
35

36 Figure 6: Photomicrographs of tibial articular cartilage (Picrosirius Red staining). (A)
37 normal Picrosirius Red staining , from control group, (B) decrease and or rearrangement of
38 thick collagen fibrils, IS7 group rat (C) reduction or rearrangement of thin fibrils, from an I
39 group rat, (400x).
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7. ANEXO II

ARTIGO SUBMETIDO – ESTUDO II: COMPARISSON BETWEEN THE EFFECTS OF REMOBILIZATION AND MUSCLE STRETCHIG AFTER IMMOBILIZATION ON THE IMMUNOSTAINING OF FIBRONECTIN AND CHONDROITIN SULFATE IN ARTICULAR CARTILAGE.

Adriana Frias Renner, Fernando Augusto Vasilceac, Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa.

Submetido ao Journal of Orthopaedic Research



Comparison between the effects of remobilization and muscle stretching after immobilization on the immunostaining of fibronectin, chondroitin sulfate in articular cartilage

Journal:	<i>Journal of Orthopedic Research</i>
Manuscript ID:	JOR-10-0129
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	22-Feb-2010
Complete List of Authors:	Renner, Adriana; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Vasilceac, Fernando; Federal University of São Carlos, Physical Therapy Mattiello-Rosa, Stela; Federal University of São Carlos, physical therapy
Keywords:	immobilization , remobilization, muscle stretching, articular cartilage



1
2
3 Comparison between the effects of remobilization and muscle stretching after
4 immobilization on the immunostaining of fibronectin, chondroitin sulfate in articular
5
6
7
8 cartilage
9

10 Authors

11
12 Adriana Frias Renner, Fernando Augusto Vasilceac, Stela Márcia Mattiello Gonçalves
13
14
15 Rosa.
16

17
18
19
20 Summary

21
22 Objective: to investigate the response of fibronectin and chondroitin sulfate after a protocol
23 of immobilization followed by remobilization and the other followed by muscle stretching
24 applied every other day. Methods: A total of 20 animals divided into 4 groups:
25
26

27 remobilized (R), immobilized and stretched 3 days/week (IS3), stretched 3 days/week
28 (S3) and control (C). Groups I, and IS3 were immobilized for 4 weeks (left hind limb).
29

30
31 After, IS3 were subjected to 3 weeks of muscle stretching (same limb), 3 times per week,
32
33

34 The S3 underwent a 3-week stretch (same limb) 3 times per week. Group C remained free
35 in cage 7 weeks. Then, the ankles were removed and processed in paraffin and incubated
36
37

38 with anti fibronectin and anti chondroitin sulfate 4. The intensities of the reactions were
39 evaluated semi quantitatively by two blind observers and described as: 0 (negative), 1
40
41
42

43 (weakly positive), 2 (positive) and 3 (strongly positive). Results: IS3 group showed
44
45

46 significantly higher intensity staining of fibronectin than the other groups. There was no
47
48
49 statistical difference of chondroitin sulfate 4 immunostaining comparing all the groups.
50

51 Conclusion: We concluded with this study that muscle stretching applied in this study had
52
53

54 increased synthesis and accumulation of fibronectin only when applied to atrophied
55
56
57 cartilage. The remobilization, in turn, did not cause glycoprotein response. Moreover, none
58
59
60

1
2
3 of the stimuli used in this study generated detectable change in the chondroitin sulfate. As a
4
5 consequence of these results there was a weak correlation between the responses of
6
7 fibronectin and chondroitin sulfate concerning the different interventions.
8
9

10
11
12 Key words:

13
14 Immobilization, muscle stretching, remobilization, articular cartilage
15
16
17

18
19
20 Introduction

21
22 Fibronectin is a glycoprotein present in small amounts in the extracellular matrix of
23
24 normal articular cartilage. It has distinct functional domains that can bind to integrins,
25
26 heparin, fibrin and collagen. As a result of the many functional domains activity, this
27
28 glycoprotein is involved in many of biological processes such as cell migration, repair,
29
30 angiogenesis and cell differentiation. There are multiple isoforms of fibronectin. They are
31
32 produced in the cell surface and deposited in the extracellular matrix as highly insoluble
33
34 fibronectin fibrils¹. However, Zack et al (2006) describes that although fibronectin is a
35
36 component to a lesser extent in the matrix of normal articular cartilage, in cultured
37
38 osteoarthritic cartilage can be up to 10 times more fibronectin. This is due to the increases
39
40 in both its synthesis and in its accumulation. It can be proteolysed into smaller fragments
41
42 in both its synthesis and in its accumulation. It can be proteolysed into smaller fragments
43
44 by multiple enzymes and this fragments is seen in the synovium and cartilage of subjects
45
46 with OA. For these authors, this glycoprotein could be a biomarker of arthritis and is
47
48 involved in the initiation and progression of the arthritic disease¹
49
50
51

52
53 Wolf et al (2003) conducted a study to investigate whether different frequencies of
54
55 cyclic mechanical loads applied intermittently in cartilage plugs could alter the biosynthesis
56
57 and retention of fibronectin. They concluded that the effect of different frequencies and
58
59
60

1
2
3 time compression and unloading of intermittent load can not be described as a correlation.
4
5 However, they state that such forms of load induced changes in the metabolism of
6
7 fibronectin, similar to those observed in human and animal osteoarthritis².
8
9

10 Differently of the fibronectin, which increases with the onset of arthritic disease, the
11
12 chondroitin sulfate, a glycosaminoglycan, an important component of the extracellular
13
14 matrix, has its depletion as an early pathophysiologic event in osteoarthritis³. Despite this
15
16 loss is a key event in the osteoarthritic process, studies in animal models showed that the
17
18 cartilage in the early degenerative process, before fibrillations occur, has a repair
19
20 hypermetabolic response with increased synthesis and degradation of these matrix
21
22 components⁴.
23
24
25
26

27 The chondroitin sulfate collaborates strongly with the compressibility of the
28
29 articular cartilage. About 100 chains of chondroitin sulfate and 100 chains of keratan
30
31 sulphate (both glycosaminoglycans) are connected to a central protein to form a molecule
32
33 of proteoglycan (aggrecan). These glycosaminoglycans create a large osmotic pressure that
34
35 attracts water to the tissue causing the collagen network expansion. The collagen molecules
36
37 remain organized in a dense fibrillar network and are embedded in a high concentration of
38
39 proteoglycan aggregates. Therefore, the property of compressibility of the articular
40
41 cartilage results from the balance between the osmotic pressure of swelling guaranteed by
42
43 proteoglycans / glycosaminoglycans and the tensile strength that is provided by collagen
44
45 fibrils. Then the ability of the articular cartilage to support loading depends on both its
46
47 composition and the organization of its matrix extracelular⁵.
48
49
50
51
52

53 The joint immobilization is still a necessary and applied resource in clinical practice
54
55 for the musculoskeletal system disorders. It is well described that such resource causes a
56
57 reduction in range of motion⁶ and atrophic changes in articular cartilage. This atrophic
58
59
60

1
2
3 cartilage, in turn, is more likely to suffer damage to certain compressive loads, which
4 normally would not be harmful⁷. All mechanical signals that the cartilage receives
5 modulate changes in biochemical activity and behavior of the chondrocyte. Compression of
6 cartilage results in complex alterations in tissue including the deformations of the matrix
7 and the cell, changes in hydrostatic and osmotic pressure and changing the matrix water
8 content⁸. The mechanical overloads⁴ or mechanical physiological loads when applied to an
9 atrophic cartilage⁷ can influence negatively and lead to an imbalance between the anabolic
10 and catabolic activities resulting in depletion of matrix components⁸.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 Some resources used for therapeutic gain of range of motion after immobilization
23 has been studied. Different aspects of the effect of muscle stretching⁹ and remobilization¹⁰
24 at the cartilage have been described. However there are no studies investigating the
25 response of fibronectin and chondroitin sulfate in these interventions.
26
27
28
29
30

31 According to the involvement of fibronectin and glycosaminoglycans in the early
32 stages of injury and repair response of articular cartilage the aim of this study was to
33 investigate their responses and correlations compared to a protocol of immobilization
34 followed by remobilization and the other followed by muscle stretching applied on alternate
35 days.
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Methods

46 Groups:

47
48 Twenty male Wistar rats, young adults at 16 weeks old and weighing on average
49 280g + 25.4 g were used for this experiment. The animals were housed in plastic cages in
50 an animal room under controlled environment conditions of light and temperature and free
51 access to water and standard food. The study was approved by the ethics committee of
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 animal research in this institution (CEEA Protocol: 15/20006).
4
5
6

7 8 Experimental Procedures: 9

10 The animals were divided into 4 groups: remobilized (R), immobilized and stretched 3 days
11 per week (IS3), stretched 3 days per week (S3) and control (C).
12
13

14
15 The R, and IS3 groups were submitted to 4 weeks of immobilization of their left
16 hind limbs with a device previously used^{9, 11}. After removal of the apparatus of the
17 immobilization R group remained free in the cage for three weeks and IS3 group underwent
18 3 weeks of stretching of the posterior muscles of the left hind limb 3 times per week.
19
20
21
22
23

24 The S3 groups remained free in the cage for 4 weeks and then underwent a 3-week
25 stretch of the posterior muscles of the left hind limb 3 times per week. The muscle
26 stretching protocol was performed under anesthesia, and consisted of maintaining the ankle
27 held in at a maximum dorsiflexion 10 repetitions of 60 s with intervals of 30 seconds of rest
28 between them. Group C remained free in the cage during the 7 weeks of the experiment.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 Preparation of the Samples

40 At the end of seven weeks, the animals were euthanized and their left ankles were removed,
41 fixed with buffered formaldehyde (10%), decalcified with nitric acid 7.5% and glycerin
42 (70ml / l of solution) and processed in paraffin. Cuts were made of 6 mm in a micrometer
43 (Leica) and mounted on slides treated with aminosilane. The samples were incubated with
44 anti-chondroitin sulfate 4 or anti-fibronectin.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 Immunohistochemistry

56
57 Anti fibronectin
58
59
60

1
2
3 The sections were hydrated in descending series of alcohol, subjected to enzymatic
4 digestion with protease (Sigma P6911) 0.025%, diluted in PBS for 15 'at room temperature,
5 and washed in PBS. To block endogenous peroxidase it was incubated in aqueous solution
6 of H₂O₂ 3% for 20 minutes, then washed with PBS plus 0.5% Triton for 10 minutes. To
7 block inespecific binding it was incubated with BSA 0.5% for 30 'and then incubated
8 overnight at 4 ° C with primary antibody rabbit anti-fibronectin (Dako) in a dilution of 1:
9 100. The secondary antibody (Vector PK 6200 kit) was used at a dilution of 1:200 for 1
10 hour at room temperature. The sections were washed in PBS and incubated with avidin
11 biotin 1:100 (Vector PK 6200 kit) for 30 '. Washed in PBS and revelated with DAB
12 chromogen solution (DAB, DAKO). The sections were counterstained with hematoxylin,
13 dehydrated and mounted with mounting medium Permount.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Anti chondroitin sulfate 4

33
34 The sections were hydrated in descending series of alcohol, incubated with
35 chondroitinase ABC (Sigma Chemical Co) 0.02 U / mL in Tris-acetate pH 8 for 30 ',
36 washed in PBS. To block endogenous peroxidase it was incubated in aqueous solution of
37 H₂O₂ 3% for 20 minutes, then washed with PBS plus 0.5% Triton for 10 minutes. To block
38 inespecific binding it was incubated with BSA 0.5% for 30 'and then incubated overnight at
39 4 ° C with primary antibody mouse anti-chondroitin-4-sulphate (Chemicon) at a dilution of
40 1:200, overnight at 4 ° C. The secondary antibody (Vector PK 6200) was used at a dilution
41 of 1:200 for 1 hour at room temperature. The sections were washed in PBS and incubated
42 with avidin biotin 1:100 (Vector PK 6200) for 30 '. Washed in PBS and revelated with
43 DAB chromogen solution (DAB, DAKO). The sections were counterstained with
44 hematoxylin, dehydrated and mounted with mounting medium Permount.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Photomicrographs were acquired through a camera attached to Zeiss microscope
4
5 with a magnification of 400x. The intensities of the reactions were evaluated semi
6
7 quantitatively by two blind observers and described as: 0 (negative), 1 (weakly positive), 2
8
9 (positive) and 3 (strongly positive) based on the study of Ustunel et al¹². Calcified layers
10
11 (between subchondral bone and tidemark) and noncalcified layers (between tidemark and
12
13 articular surface) were evaluated separately.
14
15

16
17 For the statistical analysis we used the nonparametric Kruskal Wallis test and post
18
19 hoc Newman Keuls test to compare the semiquantitative classification of fibronectin and
20
21 chondroitin sulfate 4 between the different groups. To test the correlation between the
22
23 responses of fibronectin and chondroitin sulfate 4 we used Spearman test. In all tests the
24
25 level of significance was $p \leq 0.05$ and found a strong correlation $R \geq 0.8$.
26
27
28
29
30
31

32 Results

33 Immunostaining for fibronectin

34
35
36 The immobilized and stretched on alternate days group (IS3) showed significantly
37
38 higher intensity staining of fibronectin (Figure 3A) than the stretched on alternate days ($p =$
39
40 0.03) and control groups ($p = 0.00$), (Figure 3C) in the the calcified layer. Shown in Figure
41
42 1.
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Figure 1: Mean classification of the fibronectin immunolabeling in calcified layer. R =
52
53 remobilized, IS3 = immobilized and stretched 3x/week, S3 = stretched 3x/week, C =
54
55 control. * IS3 > S3 ($p = 0.03$) and C ($p = 0.00$).
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Immobilized and stretched every other day group (IA3) presented significantly greater
7
8 intensity of immunolabeling for fibronectin than remobilized ($p = 0.00$), stretched on
9
10 alternate days ($p = 0.00$) and control groups ($p = 0.00$) in non-calcified layer (Figure 2).
11
12
13
14

15 Figure 2: Mean classification of the fibronectin immunolabeling in non-calcified layer. R =
16
17 remobilized, IS3 = immobilized and stretched 3x/week, S3 = stretched 3x/week, C =
18
19 control. IS3 $* >$ I (0.00), S3 ($p = 0.00$) and C ($p = 0.00$).
20
21
22
23

24 Figure 3: photomicrograph of immunohistochemical reaction for fibronectin. A: positive
25
26 immunostaining in the calcified layer and strongly positive immunostaining in the
27
28 noncalcified layer of the IA3 group. B: positive immunostaining in the calcified layer and
29
30 weakly positive immunostaining in the noncalcified layer of the remobilized group. C:
31
32 weak immunostaining in the calcified layer and negative immunostaining in noncalcified
33
34 layer of the control group.
35
36
37
38
39
40

41 There were no significant difference in chondroitin sulfate immunostaining among the
42
43 different groups in the calcified and non-calcified layer (Figure 4). Immunostaining for
44
45 chondroitin sulfate 4 in different groups (figure 5).
46
47
48
49
50

51 Figure 4: Mean classification for chondroitin sulfate 4 immunostaining in the noncalcified
52
53 and calcified layers. R = remobilized, IS3 = immobilized and stretched 3x/week, S3 =
54
55 stretched 3x/week, C = control. There was no difference in the comparisons among the
56
57 different groups.
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Figure 5: photomicrograph of immunohistochemical reaction for chondroitin sulfate 4. A:
7
8 positive immunostaining in the calcified layer and strongly positive immunostaining in the
9
10 noncalcified layer of the C group. B: positive immunostaining in the calcified layer and
11
12 strongly positive immunostaining in the noncalcified layer of the IA3 group.
13
14
15
16

17
18 There were weak correlation between the responses of fibronectin and chondroitin sulfate 4
19
20 in the non calcified layer comparing the different groups ($R = 0.03$ and $p < 0.05$).
21

22 A weak correlation was also observed in the calcified layer comparing the responses of
23
24 fibronectin and chondroitin sulfate 4 among the different groups ($R = - 0.19$ and $p < 0.05$).
25
26
27

28 29 Discussion

30
31 In our results we observed a significant increase in the immunostaining for
32
33 fibronectin in the immobilized and stretched group, both in the calcified and the non-
34
35 calcified layer compared to other groups.
36
37

38
39 Brandt (2003) describes that previously immobilized articular cartilage becomes
40
41 atrophic and therefore stimuli that would not be harmful in a normal articular cartilage, can
42
43 cause injuries to this atrophic one⁷. This hypothesis is confirmed when we observe that the
44
45 same muscle stretching protocol that resulted in an increase of fibronectin in the group
46
47 previously immobilized (IA3) did not result in increased immunostaining for this
48
49 glycoprotein when applied to the healthy articular cartilage of the solely stretched group.
50
51 This demonstrates that this protocol is not a harmful stimulus to a normal tissue.
52
53
54

55
56 The major problem of the accumulation of fibronectin is that besides being a
57
58 biomarker of arthritic disease¹ it is involved with deleterious effects on tissue. Several
59
60

1
2
3 studies have attempted to identify the influence of increased production and accumulation
4 of fibronectin. According to Chevalier (1993), in a review article, an increased content of
5 fibronectin during the osteoarthritic process may result in consequences related to multiple
6 functions of fibronectin and its fragments as the change of the chondrocyte phenotype,
7 change in type of collagen synthesized, activity increased site of metalloproteases and
8 induction of proteolytic activities against gelatin and fibronectin. Zack et al (2006) report
9 that has been shown that fragments of fibronectin induce metalloproteases including
10 MMP3, MMP13, and aggrecanase serine proteases. These proteases have the ability to
11 break most of the components of cartilage matrix including collagen type II and aggrecan
12 that are the hallmark of OA¹. Guo et al (2009) demonstrated that the degradation products
13 of fibronectin and its fragments generated by the damage to matrix regulate the metabolism
14 of the chondrocyte since it has many properties that express the expected remodeling or
15 extensive damage to the cartilage. Prolonged exposure of cartilage to high levels of
16 fibronectin fragments can suppress the synthesis of matrix and thus limit the anabolic
17 response of cartilage to repair¹³.

18
19 According to the damage caused by the accumulation of fibronectin we can consider
20 that the remobilized group showed a favorable response to this applied stimulus. This group
21 stayed with their levels of fibronectin equal to the control group. However, for clinical
22 practice is not feasible using only the remobilization as the only therapeutic purpose after a
23 period of immobilization. According to Trudel et al, the remobilization applied alone was
24 not sufficient to recover range of motion after a period of immobilization¹⁴.

25
26 Fragments of fibronectin are described as indirectly involved in proteoglycan break
27 down in the cartilage¹. Ayman et al (1996) state that an excessive load might lead to
28 reduced content of glycosaminoglycans¹⁵. And furthermore, the reduction of the
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 glycosaminoglycan is present in the early cartilaginous alteration related to harmful
4
5 stimuli³. However, in our study despite the increased synthesis and accumulation of
6
7 fibronectin in the group immobilized and stretched we did not observe concomitant
8
9 alteration of chondroitin sulfate in this group. A possible explanation for this result was
10
11 mentioned by Chevalier (1993). He describes, in a review article, that the content of
12
13 fibronectin already increases in cartilage while the changes in glycosaminoglycans are not
14
15 yet detected¹⁶. Another hypothesis for this result is that the fibronectin could have
16
17 stimulated proteoglycan breakdown but this decrease may not have been detected because
18
19 of the hypermetabolic repair response of chondrocytes in the face of injurious stimuli
20
21 described by Hardingham (1998)⁴. This response of increased synthesis of matrix
22
23 components could remain unchanged the levels of chondroitin sulfate in spite of this
24
25 protocol.
26
27
28
29
30

31
32 Therefore, we conclude with this study that muscle stretching applied after
33
34 immobilization stimulated fibronectin response while the remobilization did not generate a
35
36 response from this glycoprotein. Moreover, none of the stimuli used in this study generated
37
38 detectable change in the chondroitin sulfate. As a consequence of these results was a weak
39
40 correlation between the responses of fibronectin and chondroitin sulfate in the face of
41
42 different interventions.
43
44
45
46
47

48 Acknowledgements

49
50 The authors would like to acknowledge Monica Abreu and Deise Simões, Department of
51
52 Pathology, University of Sao Paulo for their technical assistance, Professor Ana Claudia
53
54 Mattiello Sverzut, Department of Pathology, University of Sao Paulo for her technical
55
56 advices, Professor Jorge Oishi, Department of Biostatistics, Federal University
57
58
59
60

1
2
3 of Sao Carlos for his helpful advice regarding statistical methods. This study was supported
4
5 by grants from CNPq (141890/2006-1) and FAPESP (2006/04112-4).
6
7
8
9

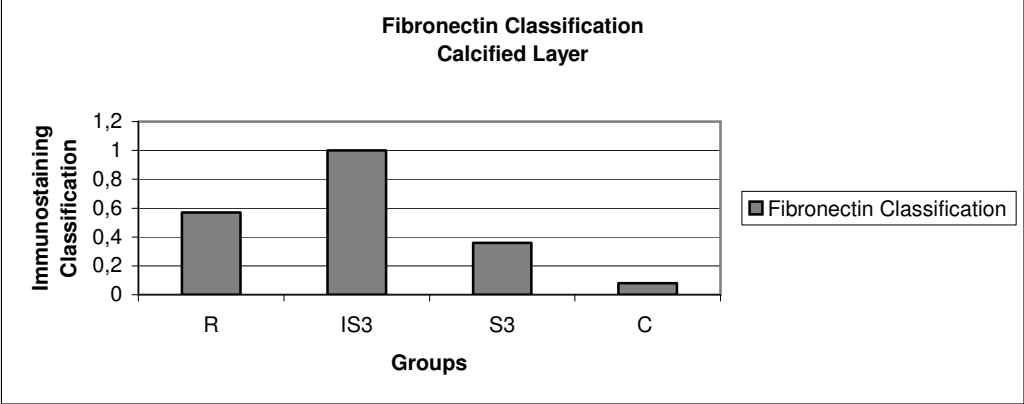
10 References

- 11
12 1. Zack MD, Arner EC, Anglin CP, et al. 2006. Identification of Fibronectin Neoepitopes
13 Present in Human Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis Rheum* 54: 2912–22.
14
- 15 2. Wolf A, Raiss RX, Steinmeyer J. 2003. Fibronectin metabolism of cartilage explants in
16 response to the frequency of intermittent loading. *J Orthop Res* 21:1081–89.
17
- 18 3. Huang K, Wu LD. 2008. Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: a
19 Review. *J Int Med Res* 36:1149 – 1160.
20
- 21 4. Hardingham 1998. Chondroitin sulfate and joint disease
22 Osteoarthritic Cartilage 6s: 3-5.
23
- 24 5. Sauerland K, Plaas AHK, Raiss RX, et al. 2003. The sulfation pattern of chondroitin
25 sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading. *Biochimica et*
26 *Biophysica Acta* 1638:241– 248.
27
- 28 6. Trudel G, Uthoff HK. 2000. Contractures Secondary to Immobility: Is the Restriction
29 Articular or Muscular? An Experimental Longitudinal Study in the Rat Knee. *Arch Phys*
30 *Med Rehabil* 81: 6-13.
31
- 32 7. Brandt KD. 2003. Response of Joint Structures to Inactivity and to Reloading After
33 Immobilization. *Arthritis Rheum (Arthritis Care & Research)* 49:267–271.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55 8. Ramage L, Nuki G, Slater DM. 2009. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-
56 matrix interactions and mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports* 19 :457-69.
57
58
59
60

- 1
2
3 9. Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa S. 2006. The effect of a passive
4 muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:196-202.
5
- 6
7 10. Haapala J, Arokoski JPA, Hittinen MM, et al. 1999. Remobilization does not fully
8 restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin ortop* 1:218-29.
9
- 10
11 11. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, et al. 2002. A new model for the
12 immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 11:1329-32
13
- 14
15 12. Ustunel I, Sahin Z, Akkoyunlu G, et al. 2003. The Zonal Distributions of Alkaline
16 Phosphatase, Adenosine Triphosphatase, Laminin, Fibronectin and Chondroitin 4-Sulphate
17 in Growing Rat Humerus Proximal Epiphyseal Cartilage: a Histochemical and an
18 Immunohistochemical Study. *Anat. Histol. Embryol* 32:356–361.
19
- 20
21 13. Guo D, Ding L, Homandberg GA. 2009. Telopeptides of type II collagen upregulate
22 proteinases and damage cartilage but are less effective than highly active fibronectin
23 fragments. *Inflamm Res* 58:161–169.
24
- 25
26 14. Trudel G, Zhou J, Uthoff HK et al. 2008. Four weeks of mobility after 8 weeks of
27 immobility fails to restore normal motion: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 466:
28 1239–1244.
29
- 30
31 15. Ali AM, Sharawy M. 1996. Histochemical and Immunohistochemical Studies of the
32 Effects of Experimental Anterior Disc Displacement on Sulfated Glycosaminoglycans,
33 Hyaluronic Acid, and Link Protein of the Rabbit Craniomandibular Joint. *J Oral Maxillofac*
34 *Surg* 54:992-1003.
35
- 36
37 16. Chevalier X. 1993. Fibronectin, Cartilage, and Osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and*
38 *Rheumatism* 122: 307-318.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

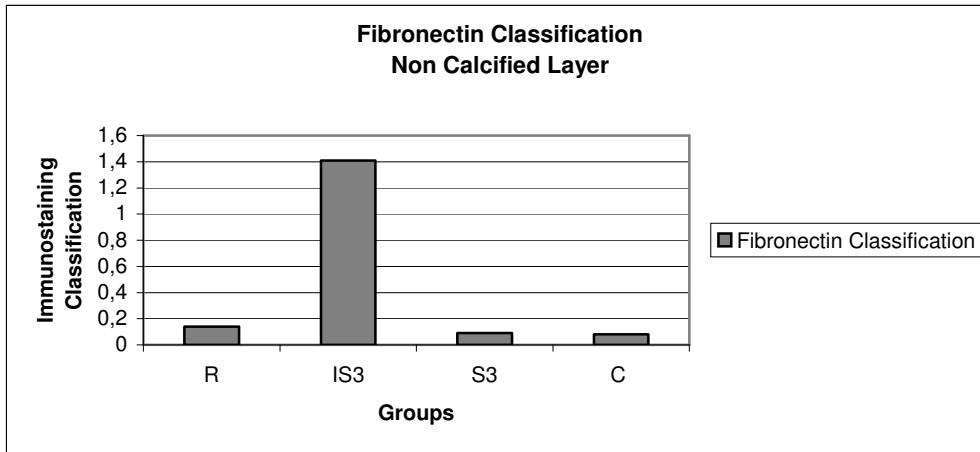
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

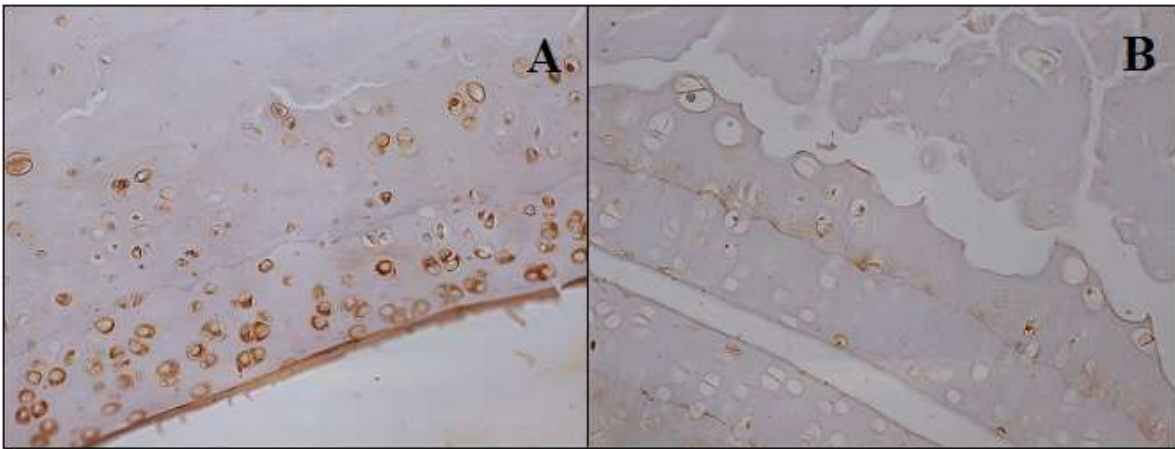


For Peer Review

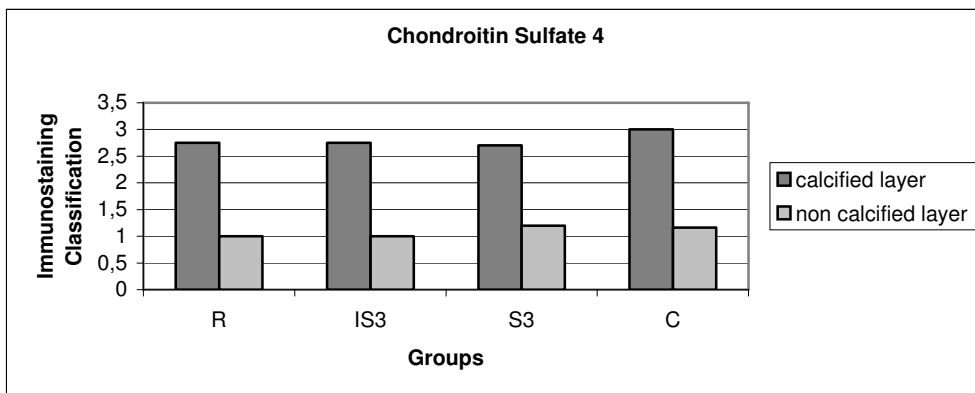
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



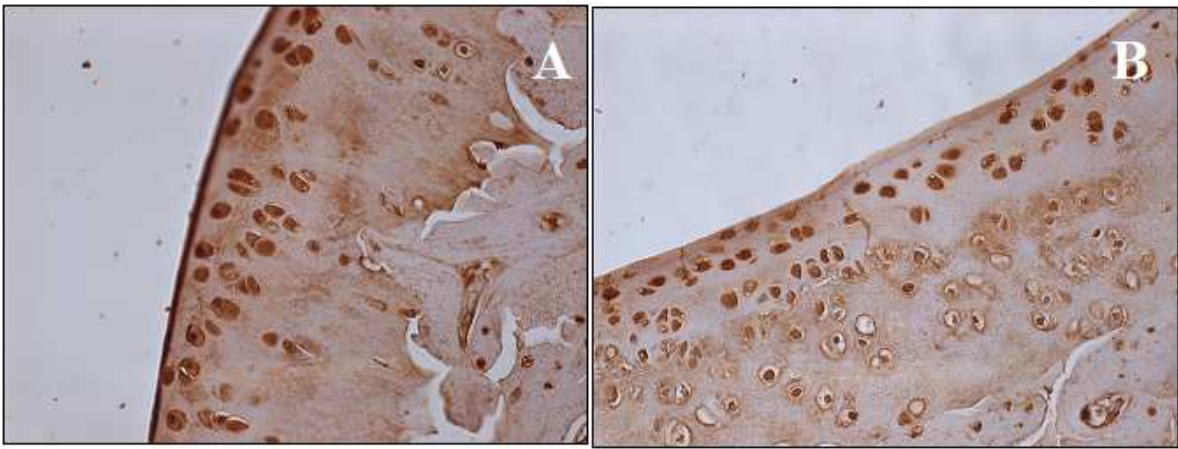
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



For Peer Review



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



For Peer Review

8. ANEXO III

ARTIGO PUBLICADO: THE REMODELING OF COLLAGEN FIBERS IN RAT ANKLES SUBMITTED TO IMMOBILIZATION AND MUSCLE STRETCH PROTOCOL.

Fernando Augusto Vasilceac, Adriana Frias Renner, Walcy Rosolia Teodoro, Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa

Rheumatology International, v30, 2010.

The remodeling of collagen fibers in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol

Fernando Augusto Vasilceac · Adriana Frias Renner ·
Walcy Rosólia Teodoro · Stela Márcia Mattiello-Rosa

Received: 18 September 2009 / Accepted: 27 January 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract To evaluate the remodeling of collagen fibers in the articular cartilage of rat ankles, with and without immobilization, after application of muscle stretching protocol. Twenty three Wistar rats were divided into four groups: immobilized (I), $n = 6$; immobilized and stretched (IS), $n = 6$; stretched (S), $n = 6$ and control (C), $n = 5$. The animals in groups I and IS were submitted to immobilization. After the period of immobilization, the animals in groups IS and S were submitted to a muscle stretching protocol. At the end of the experiment, the animals were euthanized and the joints removed, processed and stained with Picrosirius red. The analysis was carried out using a polarized light microscope. The density of collagen fibers were quantified according to the intensity of birefringence displayed. By way of statistical analyses, the right and left hind limbs of the different groups were compared based on the total density of collagen fibers, the density of thick collagen fibers and the density of thin collagen fibers. Immobilization promoted a reduction in density of the thin fibers and of total collagen. The muscle stretching protocol after immobilization promoted a reduction in density of the total collagen and of the thick fibers, but the density of the thin fibers showed the same values as control. The collagen fibers were remodeled by the different stimuli. Immobilization was harmful to the collagen fibers and the muscle stretching protocol only recovered the thin collagen fibers.

Keywords Articular cartilage · Collagen fibers · Articular immobilization · Muscle stretching

Introduction

The crucial problem in degenerative joint disease is a progressive reduction of the cartilage and its constituents, particularly collagen, which is the main constituent of articular cartilage [1–5]. The collagen exists in the form of collagen fibers in the extracellular matrix [2, 6]. These can be classified as thin fibers when less than $0.8 \mu\text{m}$ or as thick fibers when the thickness is in the range from 1.6 to $2.4 \mu\text{m}$ [6, 7]. Some authors emphasize that measurement of the integrity and organization of the collagen fibers represents the most sensitive indicator of the repair activity of articular cartilage [8, 9].

Biomechanical models have shown that changes in the collagen network directly influence the biomechanical behavior of the cartilage [10, 11]. Animal studies have shown that joint immobilization leads to mechanical, biochemical, and morphological changes, which are not always fully recovered on remobilization [5].

Some studies have shown that collagen was resistant to load application and immobilization [5, 12, 13], but there is still a discrepancy between the results of the different studies on cartilage and the mechanical stimuli applied to the joint. In general, there are different opinions about which procedure would be more appropriate to restore the functionality of the articular cartilage [14, 15].

Muscle stretching is a therapeutic method used in rehabilitation and no injury to any of the articular cartilage components has been observed [16]. However, since it promotes compressive forces it may lead to an increase or decrease in the degradation and synthesis of collagen [17],

F. A. Vasilceac · A. F. Renner · S. M. Mattiello-Rosa (✉)
Departamento de Fisioterapia da,
Universidade Federal de São Carlos,
São Carlos, SP 13565-905, Brazil
e-mail: stela@power.ufscar.br

W. R. Teodoro
Departamento de Reumatologia da,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

and it is thus possible that muscle stretching can be of benefit to the articular cartilage and hence to the collagen fibers in the articular cartilage. However, no conclusive studies were found in the literature showing the remodeling of collagen fibers with muscle stretching as a method of cartilage rehabilitation, with or without joint immobilization.

Objective

This study aimed to assess the remodeling of collagen fibers in the articular cartilage of the ankles of previously immobilized rats, after application of a muscle stretching protocol.

Methods

Experimental groups

Twenty-three male, 19 week-old albino rats weighing 320 ± 34.7 g were used in this experiment. The animals were housed in plastic cages in an animal room under controlled environmental conditions, with free access to standard food and water. The study was carried out in accordance with the guide for care and use of laboratory animals [18] and carried out in agreement with the Ethics Committee of the Federal University of São Carlos.

The animals were randomly distributed into four groups: immobilized (I), immobilized and stretched (IS), stretched (S) and control (C). The I group had their left ankles immobilized for 4 weeks. The animals were able to walk with the immobilization. The immobilization device was removed and they were allowed free cage activity for 3 weeks; the IS group had their left ankles immobilized for 4 weeks and after the immobilization device was removed, they were allowed free cage activity and submitted to a muscle stretching protocol 3 days a week for 3 weeks; the S group were allowed free cage activity for 4 weeks and then submitted to the muscle stretching protocol 3 days a week for 3 weeks; group C were allowed free cage activity for 7 weeks. In all treatments, only the left ankles were treated and the right ones remained non-treated. At the end of the 7th week all the animals were euthanized.

Immobilization procedure

Groups I and IS were anaesthetized with 0.4 ml of 1.0 mg/kg of xylazine and 0.75 mg/kg of ketamine before the procedure. The left ankle joints were immobilized in full plantar flexion with micropore and adhesive tape [19] and the immobilization device maintained in place for 4 weeks. The right hind limb was free to move. The animals were

allowed free cage activity with the device. After 4 weeks the device was removed. Group I was allowed free cage activity and group IS was submitted to the muscle stretching protocol.

Muscle stretching protocol

The groups IS and S were anesthetized and submitted to posterior left hind limb muscle stretching. The ankle joints were manually held in full dorsal flexion for $10 \times$ for 60 s periods, with a 30 s interval between each 60 s period [16]. This protocol was applied for 3 days a week for 3 weeks.

Procedure for the histological assessment

After euthanasia, the left and right (treated and non-treated) ankles were removed and the samples fixed with 4% formaldehyde. All pieces were processed and sectioned in the same way for the same person. The samples were decalcified in 7.5% nitric acid and the same concentration of glycerin, for 7 days (95 h). Then, they were divided into two pieces, with a blade at mean point between malleolus, perpendicular to the articular surface. The pieces (full half ankles e proximal and distal part) were processed in paraffin in a plane surface and cut into six sections, each half (six medial and six lateral) 6 mm thick with 50 mm between each. Complete half joint and plane surface allowed for perpendicular positioning during the paraffin processing and control of the cutting procedure in this study. The samples were stained with Picrosirius red.

Polarized light microscope analysis

The slides were examined by the same observer under optical microscope equipped with a polarizing light coupled to an image analysis system (Sony CCD Camera/Olympus Microscope BX-51). The images were analyzed with the Image Pro Plus Software, which identifies the color of the collagen fibers. The collagen fibers stained with Picrosirius red and observed under polarized light microscope shows a color that depends on the thickness of the fibers. From thin to thicker fibers the color varies from green to yellow, then to orange and finally to red [6, 7]. In brief, ten fields of each slide were analyzed, viewed with a magnification of $400 \times$. The density of the collagen fibers was expressed as a percentage of the thin or thick fiber divided by the total area (all of them detected by the software).

Statistical analysis

After quantification of the results obtained using the polarization microscope, the densities of the thick, thin and total collagen fibers were compared amongst the different

groups, comparing the results of both the non-treated (right) and treated (left) limbs. The data were analyzed using the statistical program (Statistic 7), applying the statistical test ANOVA followed by a post hoc Tukey when necessary.

Results

No ulceration or bone edema of the joint was found in the animals after the immobilization was removed, and there were no complications such as erosion, osteophytes, surface ulceration or other irregularities found in the joints of the ankles of the animals studied.

The analysis of the histological sections of the treated limbs stained with Picrosirius red allowed for an evaluation of the organization of the collagen fibers and their remodeling as a result of the interventions used in the present study. It could be seen that in groups I (Fig. 1a) and IS3 (Fig. 1b) the collagen fibers did not exhibit the same organization as shown in group S (Fig. 1c) and especially in group C (Fig. 1d). From this analysis, it could be seen that both immobilization alone and immobilization followed by the muscle stretching protocol generated disorganization of the collagen fibers in the joints, changing their organization in the articular cartilage (Fig. 1).

No differences could be seen in the non-treated limbs of any of the groups when assessed. None of the joints examined showed any statistical differences for the density of the

thin collagen fibers, the density of the thick collagen fibers or the density of total collagen. However, in the treated limbs, changes were observed in the density of the collagen fibers and in the color of the different groups when compared to the control (Fig. 2).

The analysis of the density of the thin collagen fibers showed a significant reduction for group I as compared to the other groups: I and IS ($p < 0.001$); I and S ($p = 0.001$); I and C ($p < 0.001$). The IS and S groups showed no significant difference from the control (Fig. 3).

The density of the thick fibers in the treated joints also changed in the present study. Group S showed a statistical difference in relation to the other groups with a significant reduction in the density of the thick fibers: S and I ($p < 0.001$); IS and S ($p < 0.001$); IS and C ($p < 0.001$). Groups I and S showed no significant change in their density when compared to group C (Fig. 4).

Finally, the analysis of the density of total collagen in the articular cartilage of the treated limb showed that the stimuli applied in the present study were able to generate remodeling of the collagen fibers. Group IS showed reduced values for the density of total collagen in relation to the other groups: IS and I ($p < 0.001$); IS and S ($p < 0.001$); IS and C ($p < 0.001$), and group I showed a significant reduction in their density when compared to group C: I and C ($p = 0.020$). Based on the statistical analysis, only group S showed no significant difference from the control group (Fig. 5).

Fig. 1 Photomicrograph of the articular cartilage of the treated limbs (*Picrosirius red*) showing disorganization of the collagen fibers in: **a** the immobilized group and **b** the immobilized and stretched group; and the expected organization and arrangement of the collagen fiber network in: **c** the stretched group and **d** the control

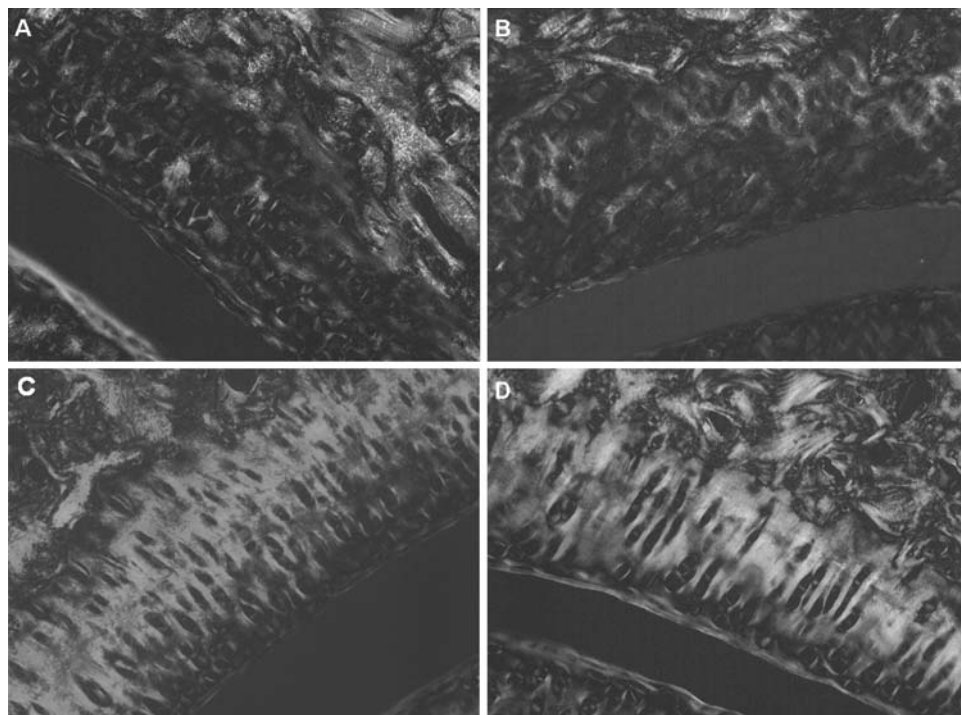


Fig. 2 Photomicrograph of the articular cartilage of the treated limbs (*Picosirius red*). Birefringence of the collagen fibers can be visualized in all groups with different colours: **a** the immobilized group; **b** the immobilized and stretched group; **c** the stretched group and **d** the control

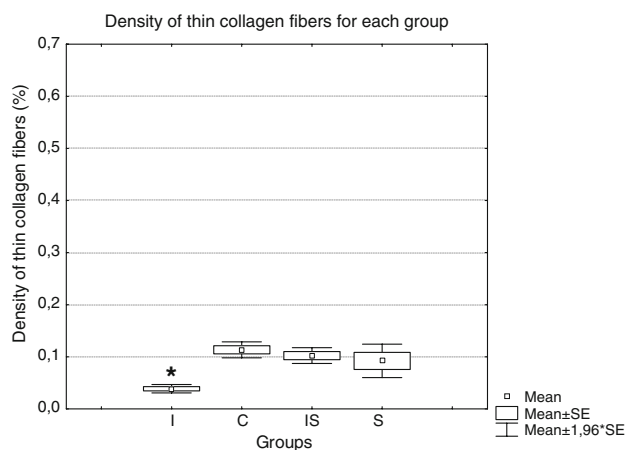
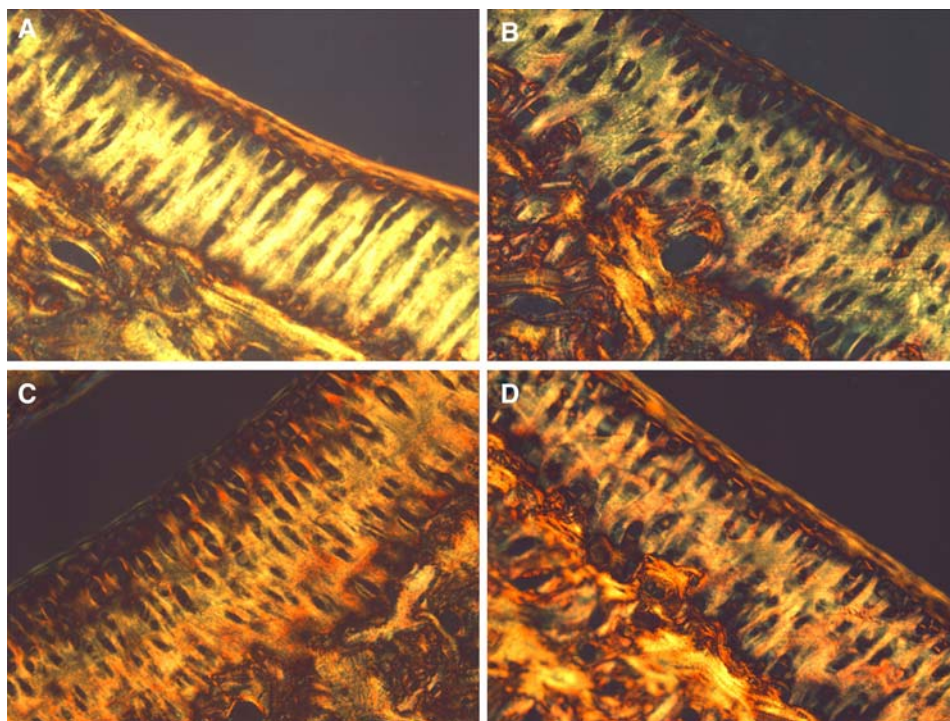


Fig. 3 Graphical representation of the percentage of thin collagen fibers with the mean and standard error. Group I shows a reduction in the density of the thin fibers as compared to the other groups. Statistically significant differences between the groups: *IS and I ($p < 0.001$); I and S ($p = 0.001$); I and C ($p < 0.001$)

Discussion

The properties of the collagen fibers evaluated in the present study were remodeled by the stimuli applied, as already demonstrated in other studies [12, 13, 20, 21]. It was observed that muscle stretching applied in normal joints was a therapeutic intervention not harmful to collagen fibers, characterizing the protocol used of muscle stretching 3 days a week for 3 weeks, as a safe intervention with

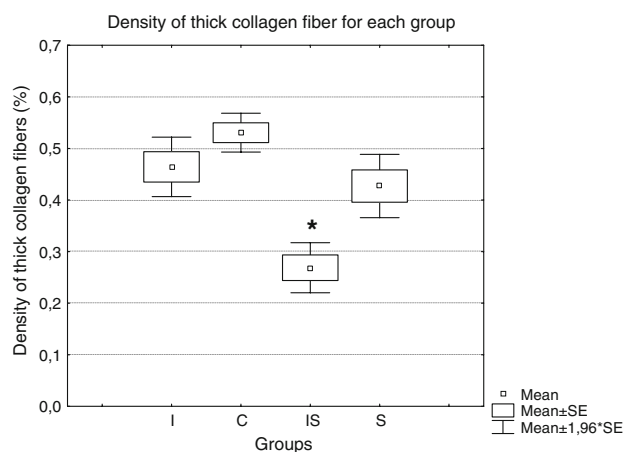


Fig. 4 Graphical representation of the percentage of thick collagen fibers with the mean and standard error. The MI group showed a decrease in the density of this type of fiber as compared to the other groups. Statistically significant differences between the groups: *IS and I ($p < 0.001$); IS and S ($p < 0.001$); IS and C ($p < 0.001$)

respect to the collagen fibers. This finding complements another study [16], where it was observed that the application of a muscle stretching protocol to joints without immobilization did not generate damage to the constituents of the articular cartilage.

However, when analyzing articular joints submitted to immobilization, it was observed that this type of intervention modified the collagen fibers, although only the thin collagen fibers were susceptible to remodeling as a result of this intervention. The fact that immobilization changes the structure of articular cartilage is well documented in the

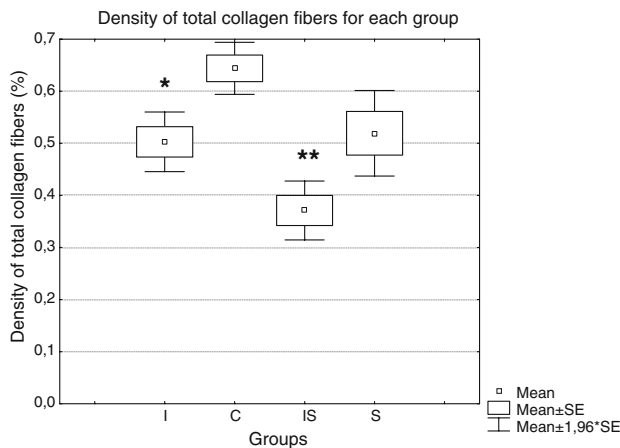


Fig. 5 Graphical representation of the percentage of total collagen fibers with the mean and standard error. Group I showed a significant reduction in their density when compared to the control group. The IS group showed a reduction in the values for the density of total collagen when compared to the other groups. *I and C ($p = 0.020$); **IS and I ($p < 0.001$); IS and S ($p < 0.001$); IS and C ($p < 0.001$)

literature [5], and some authors have even classified it as an intervention in detriment of the cartilage constituents. However, the thick collagen fibers were shown to be a structure resistant to joint immobilization. It is worth mentioning that there are several protocols for joint immobilization, resulting in the obvious difficulty of correlating the data and establishing consensus with respect to the response of collagen to immobilization.

It was observed in the present study that the same stimulus that promoted remodeling in one type of fiber did not modify the other. It seems that the thin collagen fibers began a process of remodeling in an attempt to repair the tissue, while the thick collagen fibers remained stable to minimize the deleterious effects of immobilization.

In the present study, the response observed when the joints were subjected to immobilization followed by the muscle stretching protocol was that of a reduction in the density of the thick collagen fibers, a remodeling characteristic of this type of fiber. Since the resistance of the thick collagen fibers was confined to the articular immobilization it did not support the following intervention. Such abnormal remodeling of the collagen network has also been used to justify weakening of the articular cartilage [22, 23].

The thin collagen fibers were resistant to the application of two subsequent different external stimuli. If we consider only the analysis of the values for the density of the thin collagen fibers, we could suppose that once hampered by joint immobilization, the articular cartilage was able to promote a return to the initial values for density before the muscle stretching was applied by remodeling its fibers. In this situation, the muscle stretching protocol was only an efficient method for restoring the levels of the thin collagen fibers to those present at the beginning of the experiment.

The change in density of the total collagen, deemed harmful in the present study, can be correlated with the organization and arrangement of the collagen fibers, characteristics that can be observed in the photomicrographs of the cartilage. The muscle stretching and joint immobilization procedures promoted disorganization of the collagen fibers in the tissue, a change that could also harm the tissue, representing a result reinforcing the idea that the collagen fibers had undergone remodeling and were directly affected by a process harmful to the articular cartilage.

The disorganization of the collagen fibers due to changes occurring at the start of the process of articular cartilage degeneration is well described in the literature [1, 3–5, 9], and it is also evidenced in some studies after the application of physical exercise [20] and remobilization after periods of immobilization [21]. In the present study, the chronology of the results was not observed, and thus the remodeling of the collagen fibers could be either the cause or a consequence of the disorganization of the collagen fibers. The results could also indicate that the responses of both remodeling and disorganization occur concurrently.

Conclusion

Collagen fibers are structures with remodeling properties and responded differently to the different stimuli applied in the present study. The immobilization protocol was harmful to this tissue, whereas the muscle stretching protocol was shown to be a safe intervention when applied to a healthy joint. The muscle stretching protocol, when performed after immobilization, only resulted in benefit to the thin collagen fibers.

Acknowledgments We acknowledge the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

Conflict of interest statement The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Fritz J, Pia J, Gaissmaier C, Schewe B (2008) Articular cartilage defects in the knee-basics, therapies and results. *Injury* 39:50–57. doi:[10.1016/j.injury.2008.01.039](https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.01.039)
2. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ (2008) Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22:351–384. doi:[10.1016/j.berh.2008.02.001](https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.02.001)
3. Krasnokutsky S, Attur M, Palmer G, Samuels J, Abramson SB (2008) Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16:1–3. doi:[10.1016/j.joca.2008.06.025](https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.06.025)
4. Eyre DR (2004) Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin Orthop Relat Res*, (427) 118–122. doi: [10.1097/01.blo.0000144855.48640.b9](https://doi.org/10.1097/01.blo.0000144855.48640.b9)
5. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E (2002) The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current

- concept and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 10:408–419. doi:[10.1053/joca.2002.0529](https://doi.org/10.1053/joca.2002.0529)
6. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Woiman M (1989) Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 93:27–29
 7. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 74:153–156
 8. Xiaohong BI, Yang Xu, Bostrom MPG, Bartusik D, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Camacho NP (2007) Fourier transform infrared imaging and MR microscopy studies detect compositional and structural changes in cartilage in a rabbit model of osteoarthritis. *Anal Bioanal Chem* 387:1601–1612. doi:[10.1007/s00216-006-0910-7](https://doi.org/10.1007/s00216-006-0910-7)
 9. Aigner T, Stove J (2003) Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1569–1593. doi:[10.1016/j.addr.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.009)
 10. Rieppo J, Hyttinen MM, Halmesmaki E, Ruotsalainen H, Vasara A, Kiviranta I, Jurvelin JS, Helminen HJ (2009) Changes in spatial collagen content and collagen network architecture in porcine articular cartilage during growth and maturation. *Osteoarthritis Cartilage* 17:448–455. doi:[10.1016/j.joca.2008.09.004](https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.09.004)
 11. Appleton CTG, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, Holdsworth DW, Beier F (2007) Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9:1–13. doi:[10.1186/ar2120](https://doi.org/10.1186/ar2120)
 12. Haapala J, Arokoski JPA, Hyttinen MM, Tammi M, Kovanen V, Helminen HJ, Kiviranta I (1999) Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop* 362:218–229
 13. Haapala J, Arokoski JPA, Pirttimäki J, Lyyra T, Jurvelin JS, Tammi M, Helminen HJ, Kiviranta I (2000) Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-weeks remobilization. *Int J Sports Med* 21:76–81
 14. Weigl M, Angst F, Aeschlimann A, Lehmann S, Stucki G (2006) Predictors for response to rehabilitation in patients with hip or knee osteoarthritis: a comparison of logistic regression models with three different definitions of responder. *Osteoarthritis Cartilage* 14:641–651. doi:[10.1016/j.joca.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.01.001)
 15. Simon TM, Jackson DW (2006) Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc Rev* 14:146–154. doi:[10.1097/00132585-200609000-00006](https://doi.org/10.1097/00132585-200609000-00006)
 16. Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa SM (2006) The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:196–202. doi:[10.1016/j.joca.2005.08.011](https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.08.011)
 17. Davissou T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A (2002) Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *J Orthop Res* 20:842–848. doi:[10.1016/S0736-0266\(01\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00160-7)
 18. National Research Council (1996) Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington DC
 19. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Salvini TF (2002) A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 11:1329–1332. doi:[10.1590/S0100-879X2006000700016](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000700016)
 20. Arokoski JPA, Hyttinen MM, Lapveteläinen T, Takács P, Koztaczky B, Modis L (1996) Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training detected by quantitative polarized light microscopy. *Ann Rheum Dis* 55:253–264
 21. Arokoski JPA, Jurvelin JS, Vaatainen U, Helminen HJ (2000) Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10:186–198
 22. Bae WC, Wong VW, Hwang J, Antonacci JM, Nugent-Derfus GE, Blewis ME (2008) Wear-lines and split-lines of human patellar cartilage: relation to tensile biomechanical properties. *Osteoarthritis Cartilage* 16:841–845. doi:[10.1016/j.joca.2007.11.015](https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.11.015)
 23. Gregory K, Oxford JT, Chen Y (2000) Structural organization of distinct domains within the non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. *J Biol Chem* 275:11498–11506

9. ANEXO IV

ARTIGO PUBLICADO: THE EFFECT OF A PASSIVE MUSCLE STRETCHING PROTOCOL ON THE ARTICULAR CARTILAGE.

Adriana Frias Renner, Elaine Carvalho, Edson Soares, Stela Márcia Mattiello-Rosa.

Osteoarthritis and Cartilage 14:196-202, 2006.

The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage

A. F. Renner P.T., M.S.†, E. Carvalho†, E. Soares M.D., Ph.D.‡ and S. Mattiello-Rosa P.T., Ph.D.†*

† Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil

‡ Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo

Summary

Objective: The aim of this study is to evaluate the articular cartilage alterations of rat ankles, after applying unilateral cyclic passive muscle stretching protocol in previously immobilized rats.

Methods: Twenty-two male albino rats divided into four groups, I – immobilized; IS – immobilized and stretched; S – stretched and C – control, were used in this experiment. The I and IS groups were immobilized for 4 weeks. In the muscle stretching protocol the treated ankle joint (groups IS and S) was manually full dorsal flexed 10 times for 60 s with a 30 s interval between each 60 s period, 7 days a week for 3 weeks, to stretch the ankle plantar flexors muscle group. The right hind limb was free to move. At the end of the experiment, the ankles were removed, processed in paraffin and stained with hematoxylin–eosin and Safranin-O. Two blinded observers evaluated cellularity, chondrocyte cloning and Safranin-O staining through light microscopy. And a morphometric study was carried out using a hand count of chondrocyte cells and cartilage thickness measurement.

Results: No significant effect of solely muscle stretching concerning cellularity, chondrocyte cloning and Safranin-O staining parameters was detected. However, IS group presented a significantly higher reduction of proteoglycans content than the solely stretched and solely immobilized groups and the morphometric analysis showed significant cellularity increase without thickness alteration compared to control.

Conclusions: 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.

© 2005 OsteoArthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Articular cartilage, Proteoglycans, Muscle stretching, Physiotherapy.

Introduction

Muscle stretching is a therapeutic method used in rehabilitation protocols after immobilization. Mechanical forces have great influence in the structure, organization, synthesis and rate of turnover of articular cartilage^{1,2}. The chondrocyte perceives its mechanical environment through complex biological and biophysical interactions with the extracellular cartilage matrix³.

Since articular cartilage is sensitive to abnormal loading, when it is unloaded and deprived of mechanical stimuli, there is a rapid deterioration of biochemical and biomechanical properties^{4,5}. This limitation in motion results in degenerative changes^{4,6–8}, therefore this model of reduced joint loading has been used to study the process of cartilage degeneration⁵.

However, it should be noted that the findings of several studies suggest that articular changes associated with joint immobilization are different from those associated with degenerative joint disease⁹. Haapala *et al.*¹⁰ demonstrated that immobilization causes atrophic changes in articular cartilage resulting in synthetic quiescence in this tissue. There

is a glycosaminoglycan (GAGs) depletion combined with intact collagen fibril network, which, as shown in their study, is not sufficient to initiate cartilage deterioration. Based on these results, they concluded that immobilization and changes in early osteoarthritis clearly differ.

Immobilization decreases thickness, mainly in the uncalcified region^{2,4,10} and reduces cartilage stiffness^{1,4,11,12}. Reduced proteoglycans (PG) content have also been reported following immobilization^{2,5–7}.

After immobilization removal, there are different kinds of treatment, such as, remobilization, exercise and muscle stretching¹³. The aim of previous studies was to evaluate the recovery of cartilage after remobilization, which means leaving the animal free in a cage after immobilization removal^{6,8,10,11,14,15}. Haapala *et al.*¹⁰ demonstrated that after a remobilization period, no significant thickness difference remained, compared to age matched controls. However, Kiviranta *et al.*¹¹ demonstrated no thickness recovery in some regions, mainly the ones subject to less compression. The PG concentrations that were reduced in all sample sites immediately after immobilization, remained 14–28% lower than those in controls after 50 weeks of remobilization in some regions. In the non-treated joint, there was a 49% increase of PG in some regions but a 34% decrease in others.

The response of previously immobilized articular cartilage to muscle stretching is still unclear. This therapeutic method may provide articular cartilage compression with different magnitude and duration under extreme range of motion. Chondrocytes can detect and respond to this applied load

*Address correspondence and reprint requests to: Mrs Stella Marcia Mattiello-Rosa, Ph.D., Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, Via Washington Luis km 235, 13565-905 São Carlos, São Paulo, Brazil. Tel: 55-16-3351-8039; Fax: 55-16-3361-2081; E-mail: stela@power.ufscar.br

Received 3 February 2005; revision accepted 30 August 2005.

by altering their metabolic state^{16,17}. Nevertheless, there is a lack of studies describing the effect of this kind of load in previously immobilized articular cartilage.

Objective

The purpose of this study is to evaluate the effect of a muscle stretching protocol on the articular cartilage of rat ankles, normal and previously immobilized.

Methods

EXPERIMENTAL GROUPS

Twenty-two albino male rats 16 weeks old weighing 280 ± 25.4 g were used for this experiment. The animals were housed in plastic cages in an animal room under controlled environment conditions, with free access to standard food and water. The study was conducted in accordance with the Guide for Care and Use for Laboratory Animals¹⁸. They were randomly distributed into four groups: immobilized (I), immobilized and stretched (IS), stretched (S) and control (C). The I group ($n = 6$) had their left ankles immobilized for 4 weeks and after the immobilization device was removed, they were allowed free cage activity for 3 weeks; the IS group had their ankles immobilized for 4 weeks and after the immobilization device was removed, they were allowed free cage activity and were submitted to muscle stretching protocol daily for 3 weeks; the S group were allowed free cage activity for 4 weeks and were then submitted to muscle stretching protocol daily for 3 weeks; group C were allowed free cage activity for 7 weeks. At the end of the seventh week all the animals were euthanized. For this reason we considered left ankles as treated and right ones as non-treated.

IMMOBILIZATION PROCEDURE

Groups I and IS were anesthetized with an intraperitoneal dose of Ketamine (95 mg/kg) and Xylazine (12 mg/kg) before the procedure. The Coutinho *et al.*¹⁹ model of immobilization was used. The left ankle joints were immobilized in full plantar flexion with Micropore[®] and adhesive tape and this immobilization device was kept on for 4 weeks. The device limited load and movement of the treated ankle. The right hind limb was free to move. The animal was allowed free cage activity with the device. After 7 weeks the device was removed. Group I was allowed free cage activity and group IS was submitted to the muscle stretching protocol.

INTERMITTENT PASSIVE MUSCLE STRETCHING

Groups IS and S were anesthetized and submitted to posterior left hind limb muscle stretching. The ankle joints were manually full dorsal flexed for 10 times for 60 s with a 30 s interval between each 60 s period, 7 days a week for 4 weeks.

PREPARATION OF THE SAMPLES

After euthanasia, the left and right (treated and non-treated) ankles were removed and samples were fixed with 4% formaldehyde.

HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL ANALYSES

All pieces were processed and sectioned in the same way for the same person.

The samples were decalcified in 7.5% nitric acid and the same concentration of glycerin, for 7 days (95 h). Then, they were divided into two pieces, with a blade at mean point between maleolus, perpendicular to the articular surface. The pieces (full half ankles – proximal and distal part) were processed in paraffin in a plane surface and cut into six sections, each half (six medial and six lateral) 6 μm thick with 50 μm between each. Complete half joint and plane surface allowed perpendicular positioning during paraffin processing and cut control for this study. The samples were stained with hematoxylin–eosin (H&E) and Safranin-O (three H&E and three Safranin-O) for histological and histochemical analyses, respectively. For histological and histochemical grading we used the system demonstrated in Table I. The following were evaluated: (1) cellularity, (2) chondrocyte cloning, and (3) Safranin-O staining. Each section was evaluated by two blinded observers and then correlated.

MORPHOMETRIC ANALYSIS

A morphometric study was carried out using two randomized slides (one medial and one lateral) stained with H&E of each ankle of each rat. One central field was analyzed in each slide. Axiovision 3.1 Image Analysis (Carl Zeiss)[®] was used to measure the cartilage thickness. We first measured a central thickness and than 300 μm left and right two more measures to record a mean thickness from three measures (Fig. 1), all from subcondral bone to articular surface. To hand count chondrocyte cells a 40,000 μm^2 central loading area (Fig. 2) was delimited including calcified layer and articular surface. Cells were marked also with Axiovision[®]. The same randomized slides (one medial and one lateral) were used to measure thickness.

STATISTICAL ANALYSIS

Correlation between observers (graduation of grading system) was determined by the Spearman test with $R \geq 0.8$ and $P \leq 0.05$. The Kruskal–Wallis non-parametric test with the *post hoc* Newman–Keuls ($P \leq 0.05$) was used to compare the graduation of the grading system of the

Table I
Grading system

I Cellularity	
Normal	0
Hypercellularity	1
Severe hypercellularity	2
Hypocellularity	3
II Chondrocyte cloning	
Absent	0
Occasional clone pairs	1
Dense clone pairs	2
Clone clusters	3
III Safranin-O staining	
Normal	0
Slight reduction	1
Up to half of total area	
Slight reduction	2
On total area or total surface	
Severe reduction	3
Up to half of total area	
Severe reduction	4
On total area or total surface	

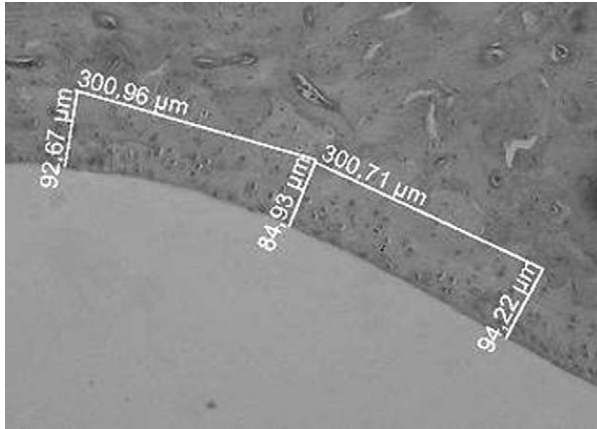


Fig. 1. Slide presenting morphometric analysis method of mean thickness measure.

non-treated and treated ankles from different groups. To compare the non-treated and treated ankles, also related to the grading system, in the same group we used the Wilcoxon non-parametric test ($P \leq 0.05$). To compare the morphometric analysis of cellularity of the treated ankles analysis among groups we used multiple comparisons Duncan test. To compare media thickness of treated ankles among groups, we used analysis of variance and also morphometric analysis.

Results

At the first day after immobilization all the animals were able to feed and drink with the device. No skin ulceration or foot swelling was found in the animals when the immobilization was removed. Within 4 days after device removal their gait seemed similar to controls.

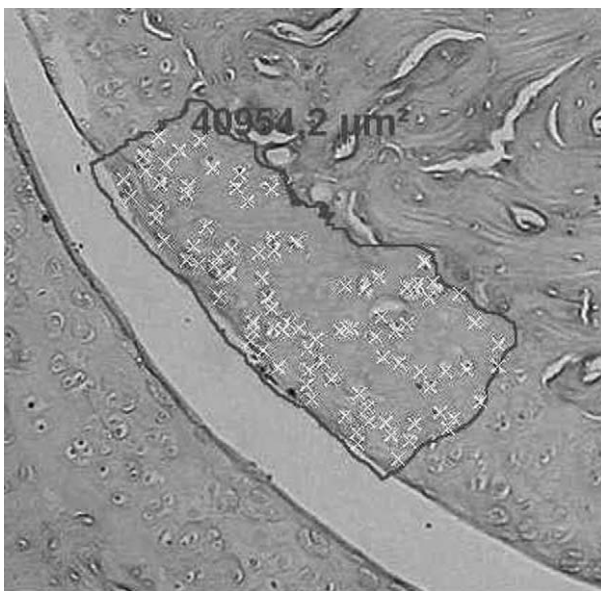


Fig. 2. Slide presenting morphometric analysis method of chondrocyte cells hand count.

Gross pathology identified that IS and I groups treated and non-treated ankles presented some areas of non-columnar organization, occasional clone pairs, hypercellularity, chondrocyte hypertrophy and tidemark irregularities. No abnormalities such as erosions, osteophytes, superficial ulcers or superficial irregularities could be found on gross inspection in IS, I, S or C group.

All sections evaluated based on grading system correlated within observers ($R \geq 0.8$ and $P \leq 0.05$).

CHONDROCYTE CLONING

The non-treated hind limb of the IS group was statistically different from all other groups. This group presented a higher grading for chondrocyte cloning than the other groups, which meant occasional cloning pairs (Fig. 3). Cloning was defined as the presence of more than one chondrocyte within the same lacunae within the surface zone of the cartilage⁵. The statistical significance of the difference from other groups was: the IS group and the I group ($P = 0.014$), the IS and the S ($P = 0.000$) and the IS and the C ($P = 0.000$). Only the IS group presented difference between the treated and non-treated limbs ($P = 0.038$). The non-treated limb presented occasional cloning pairs comparing treated and non-treated at the same group. The cloning evaluation of the treated hind limb showed a difference between the IS and the S ($P = 0.033$) (Fig. 4). The IS presented higher grading than the other groups, but is still nearly absent, while S presented smaller grading than all the other groups, and is also absent. Both groups were not statistically different from the control group (Fig. 4).

CELLULARITY

Based on qualitative analysis only the control group was different from the other groups when comparing treated or non-treated limbs among the groups. Only the C group was normal. Other groups showed a slight cellularity increase. The non-treated hind limb: C and I ($P = 0.000$), C and IS ($P = 0.000$), C and S ($P = 0.000$); treated limb: C and I ($P = 0.015$), C and IS ($P = 0.005$), C and S ($P = 0.024$) (Fig. 5). However, the non-treated hind limb from group IS showed some histological hypercellularity sections (Fig. 6).

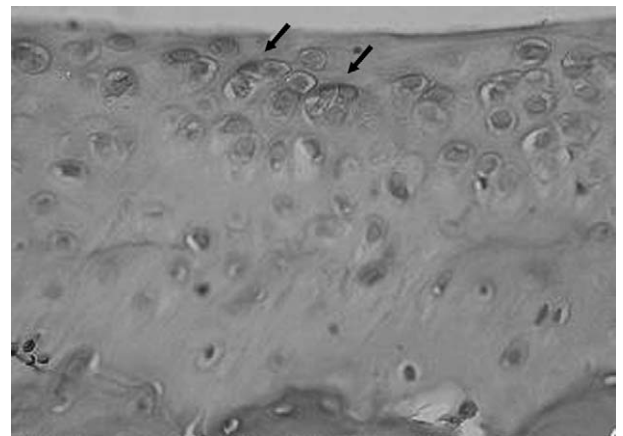


Fig. 3. Photomicrographs of tibial rat articular cartilage (H&E) Chondrocyte cloning pairs (arrowheads), section from the non-treated hind limb of IS group rat (40 \times).

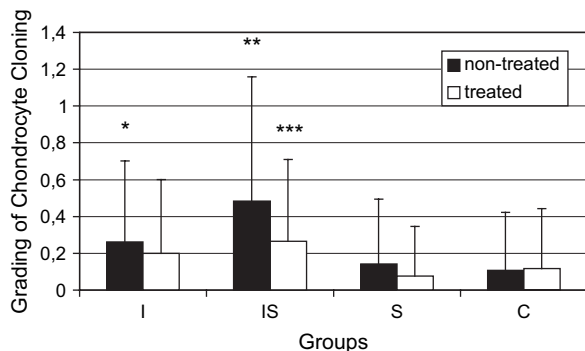


Fig. 4. Chondrocyte cloning grading of different groups. IS group presented a higher grading for chondrocyte cloning than the other groups at non-treated hind limb, which meant occasional cloning pairs. Data plotted as means \pm SD. Statistical differences in non-treated and treated limbs among groups: *I and IS groups ($P = 0.014$), **IS and I, IS and S ($P = 0.000$), IS and C ($P = 0.000$), ***IS and S, groups ($P = 0.033$).

Comparing treated and non-treated limbs in each group, IS group non-treated limb presented higher cellularity increase.

SAFRANIN-O STAINING

Assessment of Safranin-O staining among groups showed that in the I and IS groups the non-treated hind limbs were different from the other groups: I and IS ($P = 0.004$); I and S ($P = 0.000$); I and C ($P = 0.000$); IS and S ($P = 0.000$); IS and C ($P = 0.000$). The IS group presented the higher loss of the PG content [Fig. 7(C)]. Assessment of the treated hind limbs showed the same results, given that groups I and IS were different from all the others: I and IS ($P = 0.002$); I and S ($P = 0.000$); I and C ($P = 0.000$); IS and S ($P = 0.000$); IS and C ($P = 0.000$). The IS group presented a higher loss of this dye in the treated limbs as compared to different groups (Fig. 8). There was no statistical difference in the

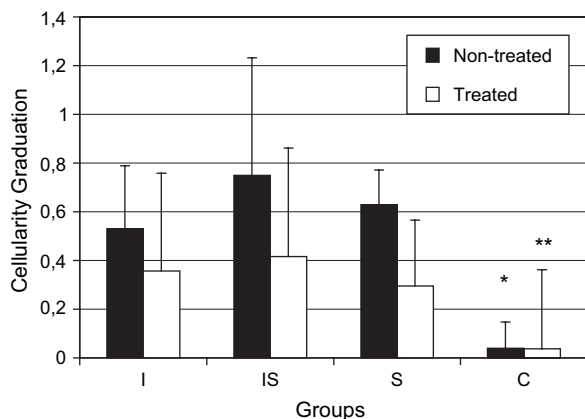


Fig. 5. Cellularity grading scores of different groups. Only the control group has normal cellularity compared to the other groups (treated or non-treated limbs) Data plotted as means \pm SD. Statistical differences in the non-treated and treated limbs comparing among groups: *C and I ($P = 0.000$), C and IS ($P = 0.000$), C and S ($P = 0.000$). **C and I ($P = 0.015$), C and IS ($P = 0.005$), C and S ($P = 0.024$).

comparison between the treated and non-treated limbs within the IS group.

MORPHOMETRIC ANALYSIS

Cellularity

The chondrocyte cells hand count confirmed that the treated ankles of the IS group showed significant higher cellularity compared to control group: IS and C, $P = 0.043$ (Fig. 9).

Thickness

No difference on mean thickness was observed comparing treated ankles among groups (Fig. 10).

Discussion

The results shown here demonstrated that the stretched group that was previously immobilized presented important tissue alterations in the treated and non-treated joint. Response of articular cartilage under immobilization/stretching and contralateral limb overloading differs according to some parameters assessed in this study. Although both limbs presented significant PG content loss as compared with other groups, treated and non-treated hind limbs presented significantly different cellularity and chondrocyte cloning responses. The non-treated hind limb of the IS group was statistically different from all other groups comparing chondrocyte cloning presence. This group presented a higher grading for chondrocyte cloning than the other groups. This hind limb in IS group was also different from controls. It presented cellularity increase at qualitative analysis. Comparing treated and non-treated limbs in each group, IS group non-treated hind limb presented higher cellularity increase. It should be mentioned that cellularity, chondrocyte cloning and loss of PG content are related to degenerative responses²⁰. The results presented here suggest a slight degenerative response of the non-treated limb in the IS group. Jortikka *et al.*¹⁴ reported an alteration in the contralateral limb and a plausible explanation for this finding was that the period of immobilization changed the gait or loading profile of this limb, promoting matrix changes in the cartilage. Andriacchi *et al.*²¹ concluded that the initiation of the degenerative changes was not directly due to the high contact pressures, but rather, it was associated to alterations in joint kinematics. Shifting the normal loading bearing regions of the cartilage to infrequently loaded regions caused mechanical damage to this cartilage.

Articular cartilage response to muscle stretching following immobilization was different from control, I and S groups, as it presented a cellularity increase, without change in cartilage thickness and a significant higher loss of Safranin-O staining. The correlation between the Safranin-O staining and the PG content of the articular cartilage has been well documented¹⁰. Previous studies used Safranin-O, a cationic dye that binds in a stoichiometric way to GAG polyanions¹¹, to evaluate articular cartilage PG content^{7,10,12}. The decrease of GAGs concentration may be one of the first detectable abnormalities following joint immobilization¹². In the present study the immobilized group also showed Safranin-O decrease, however, this decrease was significantly higher in the immobilized and

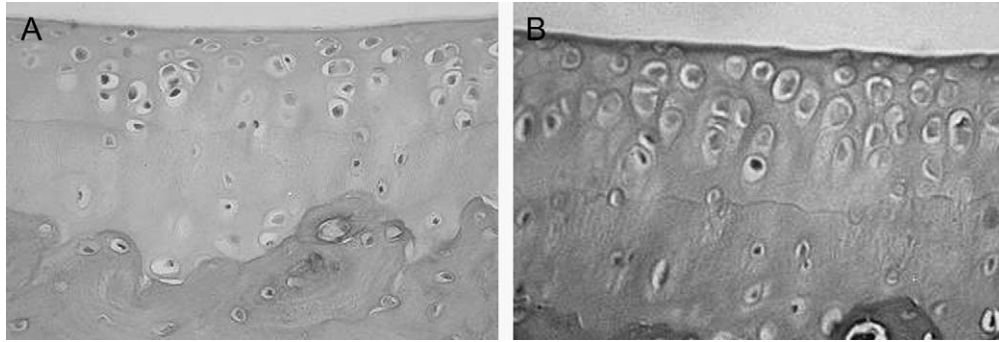


Fig. 6. Photomicrographs of tibial articular cartilage (H&E) (A) normal cellularity, non-treated hind limb from a control group rat, (B) hypercellularity, non-treated hind limb from a IS group rat (40 \times).

stretched groups. Our immobilization results were similar to previous studies^{5,6,10,14}, significant PG content loss was found. The functional capacity of articular cartilage largely depends on collagen and PG, and its depletion affects biomechanical properties. A significant correlation coefficient has been established for compressive stiffness of cartilage and concentration of GAGs, the higher the concentration of GAGs, and the stiffer the cartilage²². In qualitative analysis the IS group presented a slight reduction of Safranin-O staining in the total area while the I group showed a slight reduction up to half of the total area, both significantly different from control. The S group was normal, showing no difference from the control group. According to previous

studies there are different responses to overload according to the animal model investigated¹⁴. Despite PG content decrease, there were no thickness alterations from surface to calcified layer. It is well known that articular cartilage perceives mechanical environment. In the present study there was a significant hypercellularity following immobilization/stretching, which suggests tissue response to this stimuli.

Palmoski and Brandt²³ mention that when the integrity of the extracellular matrix of articular cartilage has been diminished by immobilization, it may be vulnerable to loading during subsequent exercise and that may damage the chondrocyte and affect its capacity for repair. They found irreversible changes after cessation of vigorous exercise

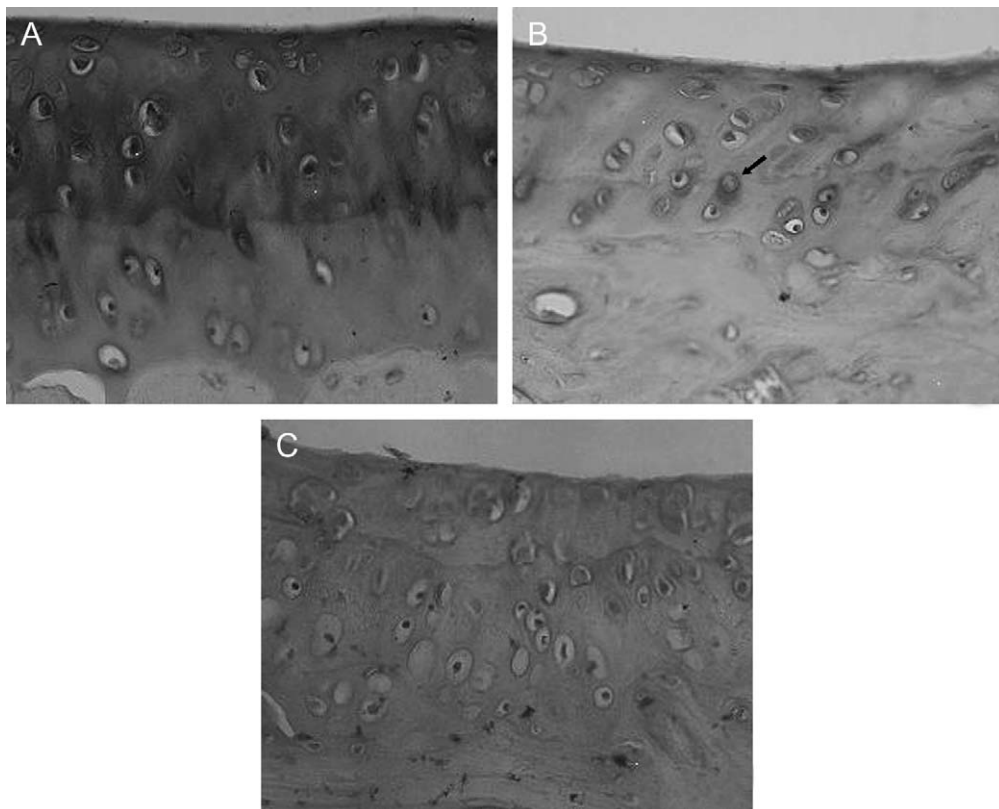


Fig. 7. Photomicrographs of tibial articular cartilage (Safranin-O staining) (A) normal Safranin-O staining intensity, treated hind limb from control group, (B) slight reduction of matrix staining intensity, matrix staining around chondrocytes (arrowhead), treated hind limb from an I group rat, (C) severe reduction on Safranin-O staining, treated hind limb from IS group rat (40 \times).

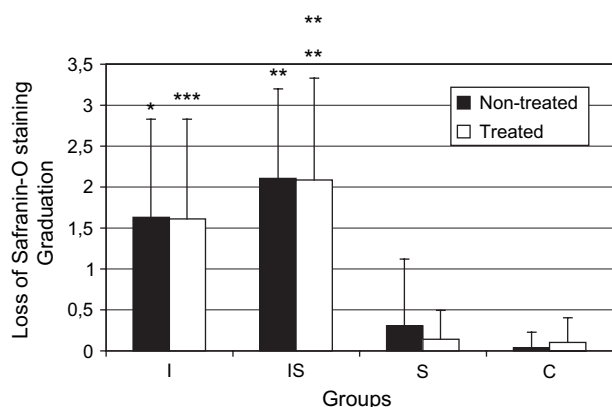


Fig. 8. Safranin-O staining non-treated and treated limb grading system among groups. The IS group presented a significant loss of the PG content (treated and non-treated hind limb) compared to other groups. Data plotted as means \pm SD. Statistical differences in non-treated and treated limbs among groups: *I and IS ($P = 0.004$), I and S ($P = 0.000$), I and C ($P = 0.000$). **IS and S ($P = 0.00$), IS and C ($P = 0.000$). ***I and IS ($P = 0.002$), I and S ($P = 0.000$), I and C ($P = 0.000$). ****IS and S ($P = 0.000$), IS and C ($P = 0.000$).

in previously immobilized canine knee cartilage. Haapala *et al.*¹⁰ based on their study suggest that lengthy immobilization of a joint can cause long lasting articular cartilage PG alterations at the same time as collagen organization remains largely unchanged. And because PG exerts strong influence on the biomechanical properties of cartilage, it may jeopardize the well being of articular cartilage. According to those conclusions we can suggest that the loss of PG content and cellularity increase found in IS group may show an articular response to applied protocol in the present study. This response seems to be harmful and irreversible.

Intermittent hydrostatic pressure (IHP) applied *in vitro* (chondrocyte cultures) demonstrated that IHP increased messenger RNA (mRNA) signals and protein levels for aggrecan and type II collagen; according to the duration and the magnitude of stimulus, mRNA aggrecan signals increased by 1 Hz after 4 h of 5 and 10 MPa compressions on the first day. However, mRNA type II collagen signals, with the same compression duration and magnitude, only increased on the fourth day. They concluded

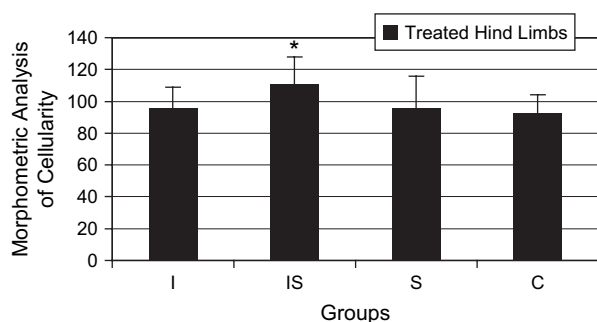


Fig. 9. Mean cellularity of different groups. IS group presented higher cellularity compared to control group (IS and C, $P = 0.043$).

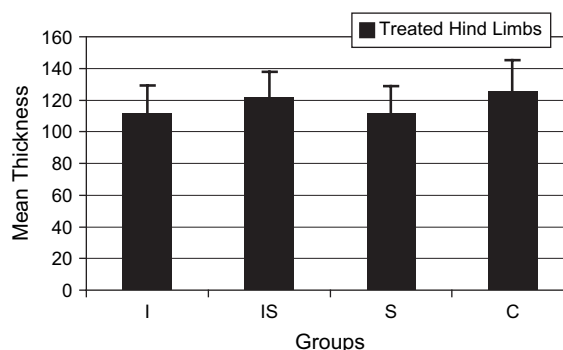


Fig. 10. Mean thickness of treated hind limbs presented no difference among groups.

that mechanoregulation of cartilage extracellular matrix *in vivo* depends on specific parameters of diarthrodial joint loading. The effect of this stimulus depends on whether the applied load is within physiological levels or at levels that exceed a normal range²⁴. Palmoski and Brandt²⁵ submitted cartilage plugs to static and cyclic stresses that were equivalent to about 1.5 times the body weight. They demonstrated a positive response, a 38% increase in synthesis of GAGs with a cycle of 4 s on/11 s off, but also a negative response, a decrease with a cycle of 60 s on/60 s off. Hall *et al.*²⁶ showed that, in the physiological pressure range (5–10 MPa), both short-term (20 s) and long-term (2 h) exposures to hydrostatic pressure stimulated PG and protein syntheses in bovine cartilage explants. In a higher pressure range (>20 MPa), however, this biosynthesis was significantly suppressed by long-term exposure, but not by short-term exposure. According to previous studies articular cartilage loading response depends on compressive duration, magnitude and rate. The results presented here demonstrated that full dorsal flexion was harmful to previously immobilized cartilage. However, the same protocol did not harm the previously non-immobilized one. Loss of range of motion is a common finding following immobilization. It is possible that a previously immobilized group required a higher compressive load to achieve the same range of motion than the solely muscle stretched group. During application of our protocol we could control the duration but not the magnitude of stimuli. Overload associated with “static” or at least “non-short time” compression could be the cause of this degenerative response.

Data found in present study suggest that it seems important to control the magnitude, rate and duration of the stretching load. Indeed, during muscle stretching protocols static compressive load are applied, but the real magnitude is still unclear. Further studies are required to find out a physiological magnitude to this clinical muscle stretching protocol in previously immobilized articular cartilage.

Acknowledgments

We acknowledge Ana Rocha, Department of Pathology, University of São Paulo for her technical assistance, Professor Jorge Oishi, Department of Biostatistics, Federal University of São Carlos for his helpful advice regarding statistical methods, Professor Walcy Rosolia Teodoro, Department of Rheumatology, University of São Paulo

and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

1. Arokoski JPA, Jurvelin JS, Väättäin U, Helminen HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10:186–98.
2. Carter DR, Beaupré GS, Wong M, Smith L, Andriacchi TP, Schurman DJ. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop* 2004;427s:s69–77.
3. Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:59–70.
4. Walker JM. Pathomechanics and classification of cartilage lesions, facilitation of repair. *J Orthop Sports Phys Ther*;28:216–31.
5. LeRoux MA, Cheung HS, Bau JL, Wang JY, Howell DS, Setton LA. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:633–40.
6. Säämänen 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;8:863–73.
7. 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;55:181–6.
8. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:408–19.
9. Hong SP, Henderson CNR. Articular Cartilage Surface Changes following immobilization of the rat knee joint. *Acta Anat* 1996;157:27–40.
10. Haapala J, Arokoski JPA, Hyttinen MM, Lammi M, Markku T, Kovanen V, *et al.* Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop* 1999;1:218–29.
11. 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;12:161–7.
12. Narmoreva 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.
13. Mattiello-Rosa SMG. Influência do Exercício em Esteira na Citologia do Líquido Sinovial e Histologia da Cartilagem Articular em Joelhos de Coelho. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.
14. Jortikka MO, Inkinen RI, Tammi MI, Parkkinen J, Haapala J, Kiviranta I, *et al.* Immobilization causes long-lasting matrix changes both in the immobilized and contralateral joint cartilage. *Ann Rheum Dis* 1997;56:255–61.
15. Haapala J, Arokoski JPA, Ronkko S, Agren U, Kosma V, Lohmander LS, *et al.* 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.
16. Suh JK, Baek GH, Arogen A, Malin CM, Niyibizi C, Evans CH, *et al.* An intermittent sub-ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:71–80.
17. Mobasher 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 Biol Int* 2002;26:1–18.
18. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC, USA: National Academy Press; 1996.
19. 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;11:1329–32.
20. 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.
21. Andriacchi TP, Mundermann A, Smith RL. A framework for understanding the *in vivo* pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Ann Biomed Eng* 2004;32:457–77.
22. 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;11:168–81.
23. Palmoski MJ, Brandt KD. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. *Arthritis Rheum* 1981;24:1329–37.
24. Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS, Lin EY, Schurman DJ, Goodman SB, *et al.* Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure *in vitro*. *J Orthop Res* 2003;21:110–6.
25. Palmoski MJ, Brandt KD. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs *in vitro*. *Arthritis Rheum* 1984;27:675–81.
26. Hall AC, Urban JPG, Gohl KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res* 1991;9:1–10.