



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

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA CARTILAGEM
ARTICULAR DE MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE.**

FERNANDO AUGUSTO VASILCEAC

São Carlos
2012



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

EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA CARTILAGEM
ARTICULAR DE MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE

FERNANDO AUGUSTO VASILCEAC

Dissertação de Mestrado apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da UFSCar - PPG-Ft, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia.

Área de Concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Stela Márcia Mattiello

São Carlos
2012

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

V334ee

Vasilceac, Fernando Augusto.

Efeito do exercício resistido na cartilagem articular de modelo animal de osteoartrite / Fernando Augusto Vasilceac. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
67 f.

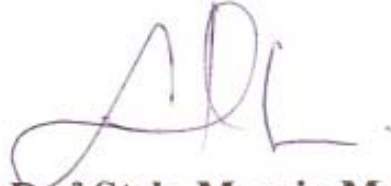
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisioterapia. 2. Osteoartrite. 3. Cartilagem. 4. Exercício resistido. I. Título.

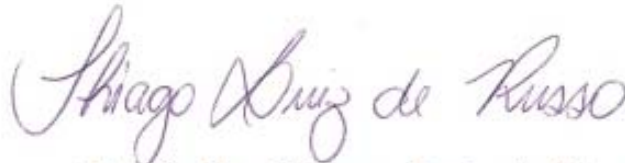
CDD: 615.82 (20ª)

Membros da banca examinadora para defesa de dissertação de mestrado de FERNANDO AUGUSTO VASILCEAC, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 29 de Fevereiro de 2012

Banca Examinadora:



**Prof.ª Dr.ª Stela Marcia Mattiello
(UFSCar)**



**Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
(UFSCar)**



**Prof.ª Dr.ª Walcy Rosólia Teodoro
(FM-USP)**

Dedicatória

*Dedico esta dissertação de Mestrado a meus pais e
minha noiva, que sempre acreditaram em mim e me
apoiaram incondicionalmente! Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço primeiramente a **DEUS!** Graças a Ele tenho minha fé e atribuo todas as minhas bençãos a sua forte presença em minha vida.*

*Agradeço aos meus pais, **Claudemir** e **Benedita**, pelo apoio e amor incondicional que dedicaram a mim. Pai, você é meu exemplo de trabalho e seriedade, por meio de seus ensinamentos desenvolvi esse trabalho com muita qualidade e respeito. Mãe, você é meu exemplo de carinho e muito amor, por meio de seus ensinamentos desenvolvi esse trabalho de forma prazerosa e saudável. Destaco que se alcancei meus objetivos, foi porque tive grandes mestres em minha vida como vocês. Apesar do nome de vocês não serem descritos na autoria desse trabalho, para mim, vocês são os principais autores dessa obra. Obrigado!*

*Agradeço a minha noiva, **Mirela**, pelo carinho, amor e muita paciência. Minha dedicação a esse trabalho muitas vezes me fez abrir mão de estar ao seu lado. Saiba que apesar de alguns momentos ter que ficar longe de você, meu coração sempre esteve preenchido com sua presença, fazendo do nosso encontro o melhor momento após um dia de trabalho. Você conseguiu absorver toda minha ansiedade e dificuldades com esse trabalho e devolveu para mim muito amor e carinho. Sua companhia e seu apoio, tornaram tudo mais fácil. Sem sua presença não seria possível o desenvolvimento desse trabalho, pois você é fundamental para toda minha vida. Amo muito você! Obrigado!*

*Agradeço a meu irmão, **Fábio**, que agora de longe, mas morando perto do coração, sempre foi e sempre será minha inspiração com meus estudos. Você é meu exemplo que a dedicação aos estudos nos traz a satisfação profissional e pessoal. Obrigado!*

*Agradeço **Prof.^a Dr.^a Stela Márcia Mattiello**, minha orientadora, que abriu as portas da pesquisa para mim, sempre de forma acolhedora e sábia. Agradeço pela confiança depositada a mim e pelo apoio sempre nas minhas decisões. Você despertou em mim a afinidade pela pesquisa e mostrou-me o caminho para desenvolver um trabalho de forma satisfatória e completa. Agradeço também aos sábios conselhos e a amizade, que é recíproca. Espero continuar correspondendo as suas expectativas com*

muito trabalho e dedicação, pois você sempre correspondeu as minhas, sendo que independente do meu futuro profissional, você sempre será minha orientadora e eu seu aluno. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos **membros da minha banca**, por aceitarem o convite de participarem desse momento de extrema importância para mim e contribuírem com minha formação profissional.

Agradeço ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de Mestrado concedida.

Agradeço aos companheiros de pesquisa, membros do Laboratório de Análise da Função Articular (LAFAr), **Adriana, Karina, Paula, Giovanna, Gisele, Luiz Fernando, Walter, Andressa, Michele e Carolina**.

Agradeço as minhas grandes amigas **Giovanna e Paula**, pelo auxílio, disposição e principalmente pela amizade para toda e qualquer ocasião. Sempre com sua praticidade de energia, agradeço você, **Giovanna**, pela amizade e sua disponibilidade em sempre me ajudar. Agradeço também por sempre que precisei ter as palavras certas para toda e qualquer ocasião, palavras essas muito sábias que sempre me ajudaram na tomada de decisões e no desenvolvimento desse trabalho. De natureza sempre altruísta, pessoa impossível de negar uma ajuda, agradeço a você **Paula**, pela disposição e iniciativa em ajudar e resolver todo e qualquer problema que apareça para mim. Agradeço também por sempre estar disponível a me escutar e conversar, e por oferecer a oportunidade de conviver com sua família maravilhosa, **Luis Felipe e Fabinho**. Muito obrigado a vocês, amigas!

Agradeço também a **Karina**, responsável pela minha consolidação no ambiente acadêmico e por muitos ensinamentos para a pesquisa e para a vida. Não exagero, você é um grande exemplo de profissional a seguir. Agradeço a grande amiga **Gisele**, que com sua inteligência e competência sempre esteve disponível para me auxiliar em minhas dúvidas, e também disponível sempre para dividir muita boa conversa. Agradeço ao **Luiz Fernando**, parceiro de café e grande parceiro de trabalho, que se tornou um grande amigo. Obrigado pela sua ajuda no meu primeiro ano do Mestrado, com a atividade de extensão da INVEL, a qual supervisionou a todos os atendimentos sozinho e com muita competência.

*Agradeço a **Adriana**, pela ajuda na parte experimental do trabalho e pelos ensinamentos desde a Iniciação Científica.*

*Agradeço a aluna de Iniciação Científica **Mariana**, pela disposição e iniciativa em desenvolver seu trabalho sob minha co-orientação e pela ajuda, com muita competência e seriedade, em todas as etapas desse trabalho. Muito obrigado!*

*Agradeço ao meu grande amigo **Anderson**, parceiro desde a Graduação, sempre presente quando precisei, até para receber bronca em meu lugar. Você é um grande amigo e parceiro para qualquer situação, seja no trabalho ou lazer. Espero preservar nossa amizade por muito tempo. Obrigado!*

*Agradeço a todos os colegas da Pós-Graduação, **Scattone, Baldon, Vanessa, Cleber, Gabriel, João, Thiago, Kido, Poli, Carla, Paulo**, e muitos outros não citei, que participam de uma discussão, tiram uma dúvida, emprestam material ou simplesmente dividem um café. Obrigado a todos vocês!*

*Agradeço também a todos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e respeitaram meu trabalho, em especial meu avô **Carmo**, minha tia **Nenê**, minha sogra **Ângela** e meu cunhadão **Lucas**, sempre me apoiando com palavras de muita força e sabedoria. Obrigado!*

E por fim a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Um muito obrigado a todos vocês!

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um protocolo de exercício resistido na cartilagem articular de modelo animal de osteoartrite (OA). Trinta e seis ratos foram divididos em 6 grupos: Controle (C), Osteoartrite (OA); Sham (S), Exercício (E), Osteoartrite e Exercício (OAE), Sham e Exercício (SE). Os grupos OA, OAE, S e SE foram submetidos à transecção cirúrgica do ligamento cruzado anterior (LCA) do joelho esquerdo, sendo que somente os grupos OA e OAE tiveram o LCA seccionado. Após 2 semanas da cirurgia, os grupos E, OAE e SE iniciaram o protocolo de exercício resistido, 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Foi aplicado o sistema de graduação histológica de Mankin, mensurado a densidade de condrócitos, a densidade de fibras colágenas e a expressão de colágeno tipo II, sulfato de condroitina e fibronectina. Os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido, OAE e SE, apresentaram menores valores para o sistema de graduação de Mankin, densidade de condrócitos e expressão de fibronectina e maiores valores para densidade de fibras colágenas, expressão de colágeno tipo II e sulfato de condroitina quando comparados aos grupos OA e S, respectivamente. O Grupo E apresentou diferença do grupo C somente na avaliação da densidade de condrócitos e na expressão de fibronectina. Portanto, o exercício resistido promove modificações no conteúdo e na expressão de diferentes constituintes da cartilagem articular, exercendo influência em nosso modelo de osteoartrite e trazendo benefícios para o tecido cartilaginoso.

PALAVRAS-CHAVES: Osteoartrite; Exercício; Colágeno; Proteoglicanos; Condrócitos; Fibronectina

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of a strength exercise protocol on articular cartilage in animal model of osteoarthritis (OA). Thirty-six rats were divided in 6 groups: Control (C, n = 6), Osteoarthritis (OA, n = 6), Sham (S, n = 6), Control with exercise (E n = 6), Osteoarthritis with exercise (OAE, n = 6) and Sham with exercise (SE, n = 6). The animal model of osteoarthritis was anterior cruciate ligament transection (ACLT) in rats. After 2 weeks of ACLT, groups E, OAE and SE started the strength exercise protocol, three times a week for 8 weeks. We used the Mankin Histologic Grading System, measured the density of chondrocytes, the density of collagen fibers and the expression of collagen type II, chondroitin sulfate and fibronectin. The groups subjected to strength exercise protocol, OAE and SE, had lower values for the Mankin score, chondrocyte density and fibronectin expression and higher values for collagen fibers density, type II collagen expression and chondroitin sulfate expression when compared with OA and S, respectively. Group E was different from group C only in chondrocyte density and fibronectin expression. Therefore, strength exercise changes the content and expression of different articular cartilage constituent, having influence on our animal model of osteoarthritis and provides benefits to the cartilaginous tissue.

KEY-WORDS: Osteoarthritis; Exercise; Collagen; Proteoglycan; Chondrocyte; Fibronectin.

LISTA DE FIGURAS

ESTUDO I

Figura 1 - Fotomicrografia da cartilagem articular, coradas com Picrosirius Red (1) e imunohistoquímica para colágeno tipo II (2). 34

Figura 2: Representação gráfica da média da porcentagem da densidade de fibras colágenas. 35

Figura 3: Representação gráfica da porcentagem de condrócitos/lacunas com imunomarcção positiva para colágeno tipo II. 36

ESTUDO II

Figura 1: Fotomicrografia da cartilagem articular coradas com Hematoxilina (1) e Safranina (2) 54

Figura 2: Representação gráfica do sistema de graduação de Mankin, 55

Figura 3: Representação gráfica da densidade de condrócitos 56

Figura 4: Fotomicrografia da cartilagem articular com imunohistoquímica para sulfato de condroitina (1) e fibronectina (2) 57

Figura 5. Representação gráfica da expressão sulfato de condroitina 58

Figura 6. Representação gráfica da expressão de fibronectina 59

LISTA DE TABELAS

ESTUDO II

Tabela 1: Sistema de graduação de Mankin

51

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1.Referências Bibliográficas	19
3. OBJETIVOS	23
4. ESTUDO I	24
Resumo	25
4.1.Introdução	26
4.2.Objetivo	28
4.3.Materiais e Métodos	29
4.4.Resultados	33
4.5.Discussão	37
4.6.Conclusão	39
4.7.Referências Bibliográficas	40
5. ESTUDO II	43
Resumo	44
5.1. Introdução	45
5.2.Objetivo	47
5.3.Materiais e Métodos	48
5.4.Resultados	53
5.5.Discussão	60
5.6.Conclusão	63
5.7.Referências Bibliográficas	64
ANEXO	67

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A osteoartrite (OA) pode ser compreendida como um resultado cumulativo de eventos mecânicos e biológicos que levam a um desequilíbrio entre a degradação e síntese dos tecidos articulares (AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006). É considerada a forma mais comum de artrite, e apresenta considerável crescimento na população, sendo que entre os idosos com mais de 65 anos, 25% apresentam OA de joelho (BREEDVELD, 2004). O impacto econômico dessa doença está relacionado às despesas com medicamentos, atendimento médico e hospitalar (GROESSL, KAPLAN, CRONAN, 2003).

Logo, estudos que envolvam o conhecimento da patogênese da doença, assim como meios de intervenção a fim de minimizar o impacto socioeconômico da doença, promovendo bem estar ao paciente, têm sido estimulados. A fisioterapia tem sido indicada em indivíduos com osteoartrite, especialmente, os exercícios de fortalecimento muscular (RODDY et al, 2005; LANGE et al, 2008).

Estudos envolvendo o exercício resistido têm sido realizados em pacientes, em que os resultados são avaliados por meio de questionários de dor, medidas funcionais, entretanto, a avaliação das mudanças ocorridas na cartilagem articular, nos constituintes da matriz é fundamental. Sabe-se que a síntese dos produtos da matriz é dependente de estímulos mecânicos, intensidade frequência e duração. Desta forma, a proposição de estudos experimentais é necessária a fim de avaliar a resposta da cartilagem frente a diferentes protocolos de exercícios físico.

Portanto, com o objetivo de aprimorar o conhecimento sobre a OA e a influência do exercício na doença, modelos animais de OA foram desenvolvidos, sendo a transecção do ligamento cruzado anterior um modelo animal que apresenta muitos aspectos patogênicos semelhantes à OA traumática que ocorre em humanos (KAAB, CLARK; NOTZLI, 2000; HAYAMI et al, 2006; APPLETON, MCERLAIN, PITELKA, 2007). Nesse modelo animal, a prática de exercício moderado não está associada com o aumento de riscos da osteoartrite. Foi demonstrado que a aplicação de exercício de forma controlada exerce uma influência positiva na progressão da OA, enquanto que, um exercício de alta intensidade não apresenta resultados benéficos e pode acelerar os danos da osteoartrite em uma articulação (APPLETON et al., 2007; GALOIS et al, 2004).

Assim, a proposta dessa dissertação de mestrado foi avaliar o comportamento da cartilagem articular em processo de degeneração frente à aplicação de um protocolo de exercício resistido. Esse trabalho visa contribuir significativamente para a investigação de uma intervenção que seja eficaz e recomendada no tratamento fisioterapêutico da OA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A osteoartrite (OA) é uma classificação clínica de uma combinação de processos patológicos que envolvem a degeneração progressiva da matriz extracelular (MEC) da cartilagem articular, o remodelamento do osso subcondral e presença de citocinas inflamatórias no líquido sinovial (ISHIGURO et al, 2002), sendo a característica marcante a destruição da cartilagem articular (ACKERMANN, STEINMEYER 2005). Para uma melhor compreensão da OA, é importante o conhecimento das características da cartilagem articular sadia e seu funcionamento em condições fisiológicas normais, pois toda essa estrutura e seu funcionamento serão modificados no processo de degeneração.

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo aneural e avascular, conseqüentemente de lento remodelamento, sendo os condrócitos, localizados em lacunas na (MEC), as únicas células presentes na cartilagem articular, (AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006; GOLDRING 2000). Sob condições fisiológicas normais são responsáveis por manter a homeostase tecidual, através do balanço entre síntese (anabolismo) e degradação (catabolismo) dos componentes da MEC (GOLDRING, 2000; ANGEL, RAZZANO, GRANDE et al, 2003; ALFORD, COLE, 2005), e o aporte nutricional do tecido e a retirada de catabólitos ocorrem através da interação entre a vascularização presente na sínovia e os condrócitos por meio do líquido sinovial (GARNEIRO et al, 2000; FELICE et al, 2002).

As propriedades do tecido cartilaginoso estão relacionadas com a composição e estrutura da MEC, que é composta principalmente por uma alta concentração de proteoglicanos enredadas em uma densa rede de fibras colágenas e uma grande quantidade de água (MARTEL-PELLETIER et al, 2005). As fibras de colágeno são compostas por colágeno tipo IX e XI e principalmente o colágeno tipo II, que é o principal colágeno da cartilagem articular (MARTEL-PELLETIER et al, 2005; VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003). Alguns autores relacionam os tipos de colágeno com a estrutura e formação das fibras colágenas, sendo o colágeno tipo XI o principal responsável pela formação de fibras finas, pois impede a adição de mais colágeno do tipo II, e o colágeno tipo IX responsável pela eficiência da fibrilogênese (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003; EYRE et al, 2002). Apesar das fibras colágenas possuírem diferentes tipos de colágenos, é consenso que o colágeno tipo II é, além do mais

abundante colágeno da cartilagem articular, o colágeno que forma a estrutura principal das fibras colágenas (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003).

Já os proteoglicanos são formados por um núcleo protéico central e possuem glicosaminoglicanas sulfatadas (sulfato de condroitina e sulfato de queratano) ligadas a esse núcleo, podendo ser encontradas como monômeros e também na forma agregada, sendo o agregado de proteoglicanos composto por uma cadeia de ácido hialurônico central (glicosaminoglicano não sulfatada) com múltiplos monômeros de proteoglicanos ligados a ele (GOLDRING, 2000; TYYNI, KARLSSON, 2000; MARTEL-PELLETIER et al, 2008). Assim, a estrutura dos proteoglicanos é influenciada pelo comprimento do ácido hialurônico, a proporção da proteína a que vai se ligar e o grau de processamento do agregado, sendo que altas concentrações de agregado são necessárias para a função da cartilagem articular de resistir às cargas compressivas (MARTEL-PELLETIER et al, 2008; SZAFRANSKI et al, 2004).

As mudanças na morfologia da cartilagem articular são influenciadas pelas adaptações deste tecido às demandas funcionais de absorção e redistribuição de forças compressivas (ANGEL, RAZZANO, GRANDE, 2003; VANWANSELE, LUCCHINETTI E, STUSSI, 2002). O tecido cartilaginoso tem como principais funções a distribuição de cargas compressivas ao longo da superfície articular, absorção de choques, permitindo o livre deslizamento durante os movimentos (ANGEL, RAZZANO, GRANDE, 2003). Estas características se devem à composição, à organização e ao sistema de expansão e contrabalanço existente na MEC e à sua superfície lisa e deslizante, com baixo coeficiente de fricção, assim, a cartilagem normal apresenta características de rigidez, elasticidade e compressibilidade (FELICE et al, 2002; ANGEL, RAZZANO, GRANDE, 2003).

Logo, a integridade do tecido cartilaginoso depende das ações de cargas sobre os componentes da matriz, em que os condrócitos respondem a essa aplicação de carga pela alteração de seu estado metabólico e com a aplicação de sobrecarga na cartilagem articular, pode-se observar o início de um processo degenerativo (ISHIGURO et al, 2002; ROOS, 2005). Portanto, a OA se desenvolve quando ocorre uma modificação na estrutura da matriz extracelular da articulação, prejudicando a função de absorção de cargas do tecido e iniciando um processo de reparação inadequado, que na tentativa de reparar essa modificação (por meio de proliferação celular) a cartilagem perde sua superfície lisa, acarretando em mais prejuízo a sua função.

Tendo se iniciado o processo osteoartrítico então, os condrócitos proliferam-se, porém, a síntese dos componentes da matriz, assim como de enzimas degradantes e citocinas catabólicas, também é estimulada, ocorrendo à degradação local de proteoglicanos e fragmentação de colágeno tipo II (GOLDRING, 2000). Citocinas, como interleucina-1 β e o fator de necrose tumoral- α , estimulam a produção de várias enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, que têm a habilidade de realizar proteólise com a maioria dos componentes da MEC (YASUDA, 2006). As ações das metaloproteinases são controladas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases, que também são sintetizados pelos condrócitos, tendo como função a inibição dos efeitos catabólicos das metaloproteinases para manter a homeostase tecidual (VANWANSEELE, LUCCHINETTI, STUSSI, 2002; AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006).

Outra molécula relacionada ao processo inicial da OA é a fibronectina, pois ela apresenta-se na cartilagem articular em quantidades muito maiores que em condições normais (ZACK et al, 2006, CHEVALIER, 1993). A fibronectina está envolvida em vários processos biológicos, como a migração celular, reparo tecidual, angiogênese e diferenciação celular e seu acúmulo está relacionado a efeitos deletérios do tecido, como alterações no fenótipo dos condrócitos, modificação no tipo de colágeno sintetizado e atividade aumentada das metaloproteinases (ZACK et al, 2006). Guo et al, (2009) demonstraram que a exposição prolongada da cartilagem a níveis elevados de fragmentos fibronectina pode suprimir a síntese de matriz e, dessa forma, limitar a resposta anabólica da cartilagem.

Diferentemente da fibronectina, que aumenta com o aparecimento de doenças da cartilagem articular, o sulfato de condroitina, um glicosaminoglicano que é um componente importante da MEC, tem a sua destruição como um evento fisiopatológico precoce em osteoartrite (HUANG, WU, 2008). Apesar de esta perda ser um evento chave no processo de osteoartrite, estudos em modelos animais mostraram que a cartilagem no processo degenerativo precoce tem uma resposta de reparação com aumento da síntese deste componente (KATTA et al, 2009; BROWN et al, 2007).

Os danos na rede de colágeno também são um evento crítico na osteoartrite devido ao ritmo muito lento de remodelamento de colágeno na cartilagem (HENROTINA et al, 2007). Segundo Vasilceac et al (2010), o colágeno articular mostrou também ser um excelente biomarcador da osteoartrite, uma vez que suas fibras apresentaram remodelamento frente a duas diferentes intervenções, a imobilização

articular e o alongamento muscular. Nesse estudo foi possível identificar que nos estágios iniciais da doença as fibras de colágeno reduzem sua quantidade na cartilagem, caracterizando a molécula de colágeno como um marcador biológico da osteoartrite.

Portanto, a fisiopatologia da OA envolve vários processos bioquímicos e microscópicos dentro do ambiente articular e do tecido cartilaginoso. A integridade condral é dependente da complexa rede de colágeno tipo II, proteoglicanos e proteínas acessórias, e as mudanças moleculares ocorridas são conseqüências de eventos de síntese e degradação pelos condrócitos, regulados por muitos fatores celulares e extracelulares. E para promover a compreensão dos aspectos fisiopatológicos da doença, modelos animais de OA têm desenvolvidos (BENDELE, 2001; APPLETON et al 2007), sendo a cirurgia de transecção do ligamento cruzado anterior freqüentemente usada como técnica cirúrgica para a indução de degeneração articular em ratos, coelhos e cães (AMEYE, YOUNG, 2006; BENDELE, 2001; KAAB et al, 2000).

A transecção desse ligamento acarreta em um déficit mecânico, que com o tempo gera alterações degenerativas na cartilagem articular do joelho, sendo identificadas as primeiras alterações principalmente após 2 semanas de cirurgia (HAYAMI et al, 2006; KAMEKURA et al 2006; GALOIS et al, 2004; APPLETON et al 2007). Nesse modelo animal de OA já foi relatado redução do conteúdo de proteoglicanos (HAYAMI et al, 2006), surgimento de osteófitos (KAMEKURA et al, 2006), fissuras, alterações no platô tibial, hipocelularidade, fibrilação do colágeno (GALOIS et al, 2004), redução do número de condrócitos, assim como sua hipertrofia e alterações no osso subcondral (APPLETON et al, 2007).

Além do desenvolvimento de modelos animais de OA, tem-se estudado muito a respeito de uma intervenção eficaz na reabilitação do paciente portador de OA. Estudos demonstraram que humanos com osteoartrite de joelho apresentam decréscimo da função dos músculos da coxa, sobretudo do quadríceps (SLEMENDA, BRANDT, HEILMAN, 1997; ZHANG et al , 2008), pois a articulação afetada pela osteoartrite apresenta estímulos aferentes alterados, que geram uma redução da estimulação do motoneurônio eferente do músculo funcionalmente relacionado à articulação (inibição artrogênica), acarretando em desequilíbrio entre as forças musculares que garantem estabilidade à articulação (HORTOBÁGYI et al, 2004). Assim, a capacidade das estruturas ao redor da articulação afetada em absorver forças articulares diminui, e

conseqüentemente a carga excessiva é transmitida para a superfície articular acelerando o processo da doença.

Nessa situação, o exercício resistido na OA tem sido recomendado principalmente para incremento de força da musculatura do quadríceps (LANGE et al, 2008; WILK et al, 2006; BRANDT, HEILMAN, SLEMENDA, 2000; SLEMENDA et al, 1997). A literatura justifica a aplicação do exercício resistido, porém muitas questões a respeito, como intensidade, duração e frequência ainda precisam ser respondidas (APPLETON et al, 2007; BENNELL, HINMAN, 2005; RODDY et al, 2005), pois a aplicação de exercício físico ainda não é consenso na OA, já que alguns autores consideram a atividade física um fator de risco para o desenvolvimento da OA, (APPLETON et al, 2007; LAPVETELAINEN et al, 2002). Na verdade, exercícios extenuantes ou de alto impacto realmente podem levar a incapacidade da articulação e desenvolvimento da doença, mas exercícios de intensidade moderada trazem benefícios para indivíduos com OA, como melhora da marcha, o equilíbrio e principalmente a força muscular. (HUNTER, ECKSTEIN, 2009; SUTTON et al, 2001; PETRELLA, BARTHA, 2000; HURLEY, SCOTT, 1998).

Nos modelos animais de OA, poucos estudos têm demonstrado os efeitos do exercício, sendo descrito que o exercício aeróbico traz benefícios para cartilagem articular, aumentando os níveis de enzimas que atuam na defesa contra a ocorrência de stress oxidativo e diminuindo algumas das alterações características da OA, como redução do conteúdo de proteoglicanos, formação de fibrocartilagem e apoptose de condrócitos (CIFUENTES et al, 2010; GALOIS et al 2004). Também já foi descrito que em porcos da índia jovens, submetidos a exercícios em esteira, houve aumento da organização e quantidade de colágeno (HYTTINEN et al, 2001)

A compressão e carga imposta à cartilagem através de uma intervenção terapêutica têm grande influência na organização e fisiologia dos constituintes da matriz cartilaginosa (AROKOSKI et al., 2002). A hipótese do estudo é que o exercício resistido seja capaz de promover um remodelamento da cartilagem articular em processo de degeneração, no intuito de consolidá-lo com uma potencial intervenção a ser utilizada no tratamento da OA.

2.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER T, SOEDER S, HAAG J. IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cell Mater**, v. 12, p. 49-56, 2006.

BREEDVELD FC. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. **Rheumatology**, v. 43, p. 14-18, 2004.

GROESSL EJ, KAPLAN RM, CRONAN TA. Quality of well-being in older people with osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 49, p. 23-28, 2003.

RODDY E, ZHANG W, DOHERTY M. Aerobic walking or strengthening exercise for osteoarthritis of the knee? A systematic review **Ann Rheum Dis**, v. 64, p. 544-548, 2005.

LANGE AK, VANWANSEELE B, SINGH, MAF. Strength Training for Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**, v. 59, p. 1488-1494, 2008.

KAAB MJ, ITO K, CLARK JM, NOTZLI HP. The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, p. 464-473, 2000.

HAYAMI T, PICKARSKI M, ZHUO Y, WESOLOWSKI GA, RODAN AG, DUONS TL. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, v. 38, p. 234-243, 2006.

APPLETON CTG, McERLAIN DD, PITELKA V, SCHWARTZ N, BERNIER SM, HENRY JL. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 9, p. 3-15, 2007

GALOIS L, ETIENNE S, GROSSIN L, WATRIN-PINZANO A, COURNILHENRIONNET C, LOEUILLE D, NETTER P, MAINARD D, GILLET P. Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, p. 779-786, 2004.

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

ACKERMANN B, STEINMEYER J. Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, p. 906-914, 2005.

GOLDRING, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, p. 16-26, 2000.

ANGEL J, RAZZANO P, GRANDE, D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage repairs and response to injury. **Sports Med Arthrosc Rev**, v. 1, p.168-181, 2003.

ALFORD JW, COLE BJ. Cartilage Restoration, Part 1. **American Journal of Sports Medicine**, v. 33, 2005.

GARNERO P, ROUSSEAU JC, DELMAS PD. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone cartilage and synovium in joint diseases. **Arthritis Rheum**. v. 43, p. 953-968, 2000.

FELICE JC, COSTA LFC, DUARTE DG, CHAHADE, WH. Elementos básicos de diagnóstico da osteoartrose. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.11, p. 68-81, 2002.

MARTEL-PELLETIER J; BOILEAU C; PELLETIER JP; ROUGHLEY PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis Conditions **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 22, p. 351-384, 2008

VELOSA, APP, TEODORO WR, YOSHINARI NH. Colágeno na cartilagem osteoartrósica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, p. 160-166, 2003.

EYRE D. Collagen of articular cartilage. **Arthritis Res**, v. 4, p. 30-35, 2002.

TYJNI A, KARLSON J. Biological treatment of joint cartilage damage. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, p. 249-265, 2000.

SZAFRANKI JD, GRODZINSKY AJ, BURGER E, GASCHEN V, HUNG HH, HUNZIKER EB. Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, p. 937-946, 2004.

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

ROOS EM. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, p.195-200, 2005.

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

ZACK, M. D.; ARNER, E. C.; ANGLIN, M. D.; ALSTON, J. T.; MALFAIT, A. M.; TORTORELLA, M. D. Identification of fibronectin neopeptides. **Arthritis Rheum**, v. 54, p. 2912-2922, 2006.

CHEVALIER X. Fibronectin, Cartilage, and Osteoarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 122, p. 307-318, 1993.

GUO D, DING L, HOMANDBERG GA. Telopeptides of type II collagen upregulate proteinases and damage cartilage but are less effective than highly active fibronectina fragments. **Inflamm Res**, v. 58, p. 161-169, 2009.

HUANG K, WU LD. Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: a Review. **J Int Med Res**, v. 36, p. 1149-1160, 2008.

KATTA J, JIN Z, INGHAM E, FISHER AJ. Chondroitin sulphate: an effective joint lubricant? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, p. 1001-1008, 2009.

BROWN MP, TRUMBLE TN, PLAAS AHK, SANDY JD, ROMANO M, HERNANDEZ J, et al. Exercise and injury increase chondroitin sulfate chain length and decrease hyaluronan chain length in synovial fluid. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 1318-1325, 2007.

HENROTINA Y, ADDISONB S, KRAUSB V, DEBERGA M. Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 19, p. 444-450, 2007.

VASILCEAC FA, RENNER AF, TEODORO WR, MATTIELLO-ROSA MG. The remodeling of collagen fiber in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International**, v. 31, p. 737-742, 2011.

AMEYE LG, YOUNG MF. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the 'Holy Grail'. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, p. 537-547, 2006.

KAAB MJ, ITO K, CLARK JM, NOTZLI HP. The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, p. 464-473, 2000.

KAMEKURA S, HOSHI K, SHIMOAKA T, CHUNG U, CHIKUDA H, YAMADA T. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, p. 632-641, 2005.

SLEMENDA C, BRANDT KD, HEILMAN DK. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. **Ann Intern Med**, v. 127, p. 97-104, 1997.

ZHANG W, MOSKOWITZ RW, NUKI G, ABRAMSON S, ALTMAN RD, ARDEN N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. 137-162, 2008.

HORTOBÁGYI T, GARRY J, HOLBERT D, DEVITA P. Aberrations in the control of quadriceps muscle force in patients with knee osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 51, p. 562-569, 2004.

WILK KE, BRIEM K, REINOLD MM, DEVINE KM, DUGAS JR, ANDREWS JR. Rehabilitation of articular lesions in the athlete's knee. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 10, p. 815-827, 2006.

BRANDT KD, HEILMAN DK, SLEMENDA C. A comparison of lower extremity muscle strength, obesity, and depression scores in elderly subjects with knee pain with

and without radiographic evidence of knee osteoarthritis. **J Rheumatol**, v. 27, p.1937-1946, 2000.

BENNELL K, HINMAN R. Exercise as a treatment for osteoarthritis Current **Opinion in Rheumatology**, v. 17, p. 634-640, 2005.

LAPVETELAINEN T, HYTTINEN MM, SAAMANEN AM, LANGSJO T, SAHLMAN J, FELSZEGHY S, et al. Lifelong voluntary joint loading increases osteoarthritis in mice housing a deletion mutation in type II procollagen gene, and slightly also in non-transgenic mice. **Ann Rheum Dis**, v. 61, p. 810-817, 2002.

HUNTER DJ, ECKSTEIN F. Exercise and osteoarthritis **J. Anat**, v. 214, p. 197-207, 2009.

SUTTON AJ, MUIR KR, MOCKETT S, FENTEM P. A casecontrol study to investigate the relation between low and moderate levels of physical activity and osteoarthritis of the knee using data collected as part of the Allied Dunbar National Fitness Survey. **Ann Rheum Dis**, v. 60, p. 756-764, 2001.

PETRELLA RJ, BARTHA C. Home based exercise therapy for older persons with knee osteoarthritis: a randomized clinical trial. **J Rheumatol**, v. 27, p. 2215-2221, 2000.

HURLEY MV, SCOTT DL. Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. **Br J Rheumatol**, v. 37, p. 1181-1187, 1998.

CIFUENTES DJ, ROCHA LG, SILVA LA, BRITO AC, RUEFF-BARROSO CR, PORTO LC, et al. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 1088-1095, 2010.

AROKOSKI JPA, JURVELIN JS,VAATAINEN U, HELMINEN HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, p. 186-198, 2000.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito de um protocolo de exercício resistido na cartilagem articular osteoartrítica de joelhos de ratos após a transecção do ligamento cruzado anterior.

Os objetivos específicos desse estudo são:

- Avaliação do colágeno articular do modelo animal de osteoartrite submetido ao protocolo de exercício resistido;
- Avaliação do condrócito, proteoglicanos e fibronectina da cartilagem articular de modelo animal de osteoartrite submetido ao protocolo de exercício resistido.

4. ESTUDO I

EXERCÍCIO RESISTIDO PROMOVE REMODELAMENTO DO COLÁGENO ARTICULAR DE MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE

VASILCEAC, FA.¹; SOUZA, MC.¹; MATTIELLO, SM¹.

¹ Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve como objetivo realizar uma avaliação do colágeno articular de modelo animal de osteoartrite submetido à aplicação de um protocolo de exercício resistido.

Materiais e Métodos: 24 ratos foram divididos em 4 grupos: Modelo animal de osteoartrite (OA); Sham (S), Modelo animal de osteoartrite e exercício (OAE); Sham e exercício (SE). Todos os grupos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para a transecção do LCA, porém os grupos S e SE não tiveram o ligamento seccionado. Após duas semanas da cirurgia, os grupos OAE e SE iniciaram o protocolo de exercício resistido, três vezes por semana, durante oito semanas. Ao final do experimento, as articulações do joelho de todos os animais foram coletadas, processadas em parafina e confeccionadas lâminas histológicas de cada articulação. Para a avaliação da densidade de fibras colágenas as lâminas foram coradas com Picrosirius Red e para a avaliação da expressão de colágeno tipo II foi feita a técnica de imunohistoquímica para colágeno tipo II.

Resultados: Os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido, OAE e SE, apresentaram maiores valores para a densidade de fibras grossas de colágeno, densidade total de fibras colágenas e expressão de colágeno tipo II quando comparados os grupos que não realizaram o exercício resistido.

Conclusão: O exercício resistido promove remodelamento do colágeno articular de modelo animal de osteoartrite, atuando no controle da redução do total de fibras colágenas e trazendo benefícios para o tecido cartilaginoso na OA.

PALAVRAS-CHAVES: Osteoartrite, Colágeno, Exercício.

4.1. INTRODUÇÃO

O exercício resistido é uma das modalidades terapêuticas recomendadas para indivíduos com osteoartrite (OA) no joelho (Lange et al, 2009; Zhang et al, 2008; Roddy et al, 2005), pois estudos mostram que o treinamento de resistência progressiva tem potencial para reduzir a progressão da OA por meio da estabilidade da articulação do joelho, ajudando a proteger e prevenir a cartilagem de maior degeneração, e pelo aumento na síntese de componentes da cartilagem da matriz estimuladas pela carga, retardando as alterações normalmente vistas na OA (Lange et al, 2009).

O colágeno é um dos principais constituintes da matriz cartilaginosa e sofre alterações na OA, pela ruptura da sua rede de fibras e diminuição de seu conteúdo (Henrotina et al, 2007; Velosa, Teodoro, Yoshinari, 2003; Poole et al, 2003). São poucos os estudos que investigaram a influencia do exercício sobre a articulação, porém esses estudos descrevem que o exercício físico o comportamento do colágeno presente da matriz cartilaginosa (Kawac et al, 2008; Bank et al, 2000; Arokoski et al, 1996). A aplicação de exercício de alta intensidade em cavalos com OA desencadeou a presença de fragmentos de colágeno no líquido sinovial, que foram correlacionados a edema ósseo da articulação, mostrando prejuízo para a cartilagem articular (Kawac et al, 2008), além de alterações significativas na rede de colágeno como afrouxamento e microlesões (Bank et al, 2000). Da mesma forma, exercícios extenuantes desencadeara diminuição das fibras colágenas e redução do colágeno em cães (Arokoski et al, 1996),

Os estudos com a aplicação de exercícios em modelos animais de OA tem avaliado o conteúdo geral de proteoglicanos e stress oxidativo (Cifuentes et al, 2010) e também a apoptose de condrócitos (Galois et al, 2004), demonstrando resultados satisfatórios por meio da aplicação de exercício aeróbico de moderada intensidade. Entretanto, ainda não há respostas sobre o comportamento do colágeno frente ao exercício resistido.

Considerando então que o exercício físico exerce influência no colágeno articular (Kawac et al, 2008; Bank et al, 2000; Arokoski et al, 1996) e que a aplicação de um protocolo de exercício de forma controlada e de moderada intensidade traz bons resultados para a cartilagem articular (Cifuentes et al, 2010; Galois et al, 2004), acredita-se que o exercício resistido seja capaz de promover um remodelamento no

colágeno articular, modificando as alterações do colágeno presente na OA. Portanto, faz-se necessário um estudo que avalie o colágeno articular de um modelo animal de OA submetido à aplicação de um protocolo de exercício resistido

4.2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo realizar uma avaliação do colágeno articular de modelo animal de osteoartrite submetido à aplicação de um protocolo de exercício resistido.

4.3. MATERIAS E MÉTODOS

4.3.1. Animais

Foram utilizados 24 ratos machos *Wistar* (300 ± 10 g) do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, que permaneceram agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso a água e ração. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar), com as condições ambientais controladas (luminosidade: ciclo de 12h claro/escuro). O experimento foi conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996) e o projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Parecer CEA/UFSCar n° 021/2010).

4.3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos: Modelo animal de osteoartrite (OA); Sham (S), Modelo animal de osteoartrite e exercício (OAE); Sham e exercício (E). O modelo animal de OA utilizado foi o da transecção do LCA. Todos os grupos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos da transecção do LCA, porém os grupos S e SE não tiveram o ligamento seccionado. Os animais ficaram em livre deambulação nas gaiolas por duas semanas após a cirurgia, posteriormente os grupos OAE e SE iniciaram o protocolo de exercício resistido, três vezes por semana, durante oito semanas. Os grupos OA e S permaneceram livres em deambulação no mesmo período do protocolo de exercício resistido. Ao final do experimento, totalizando 10 semanas, todos os animais foram eutanasiados.

4.3.3. Modelo animal de osteoartrite

A cirurgia de transecção do LCA foi realizada com os animais anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 20 mg/Kg/peso corporal e ketamina 90 mg/Kg/peso corporal), seguindo as recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996). A cirurgia foi realizada no joelho esquerdo. Previamente a cirurgia, os joelhos dos animais foram tricotomizados e realizada incisão de aproximadamente 1cm na região medial do joelho. Posteriormente a patela foi deslocada medialmente e o joelho flexionado a fim de expor o LCA. Com tesoura

oftálmica o LCA foi seccionado. Posteriormente, a patela foi recolocada e os tecidos foram suturados (Galois et al, 2004). Um teste de gaveta anterior positivo validou a transecção do LCA. Destaca-se que os animais do grupo S e SE receberam os mesmo procedimentos descritos anteriormente, entretanto o LCA foi mantido íntegro.

4.3.4. Protocolo de exercício resistido

Os animais escalaram uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com uma carga presa em suas caudas (Hornberg, Farrar, 2004). O aparato de carga foi preso a porção proximal da cauda do animal com uma fita-adesiva (Micropore®). No topo da escada os animais alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm), como apoio.

O protocolo de exercício resistido foi adaptado de Hornberger, Farrar (2004). No primeiro dia do protocolo foi calculada a carga de resistência máxima inicial (RMI) cada animal. Foi feita uma escalada inicial com 50% do peso corporal do animal (± 150 g), depois foi adicionado uma carga de 10% do peso corporal do animal (± 30 g) até o mesmo interromper a subida. Foi interrompido quando o animal permanecia mais de 30s parado ou quando escorregava. A RMI foi determinada pela última carga que o animal conseguiu realizar uma escalada completa.

Os animais faziam 10 escaladas por sessão com 30 segundos de intervalo entre cada escalada, 3 sessões por semana em dias alternados por um período total de 8 semanas. A carga do protocolo de exercício resistido foi progressiva, na seguinte evolução: 1ª e 2ª semana 50% da RMI, semanas 3 e 4 com 75% da RMI, 5ª e 6ª semana 90% da RMI, 7 e 8 semanas com 100% da RMI. Dois dias antes de iniciar o protocolo, os animais realizaram um protocolo de familiarização, entretanto sem carga. Os animais que não se adaptaram à familiarização foram excluídos. Não foi realizado qualquer estímulo nocivo para o animal realizar a escalada.

4.3.5. Processamento histológico das articulações

Após a eutanásia dos animais, os joelhos esquerdos foram removidos e desarticulados, separando para o estudo o côndilo femoral de cada articulação, que posteriormente foi fixado em Formol a 10% por 3 dias e submetido à descalcificação em Ácido Nítrico a 7,5%, acrescido de glicerina na mesma concentração durante aproximadamente 10 dias. Esse material foi processado em parafina e emblocado,

obtendo-se um bloco para cada côndilo femoral. Posteriormente, cada bloco foi cortado no plano sagital em Micrótomo (LEICA[®], Alemanha), sendo selecionado o côndilo femoral medial para a avaliação. Os 30 primeiros cortes de 6 µm foram descartados, e a partir da, cortes de 6µm foram selecionados para a montagem das lâminas.

4.3.6. Avaliação da densidade de fibras colágenas

Para a avaliação da densidade de fibras colágenas, as lâminas foram coradas com Picrosirius Red. Foram feitas fotomicrografias das lâminas por meio de um microscópio óptico equipado com um polarizador de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75, Tokyo, Japão). Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada imagem capturadas ao longo da extensão de cada lâmina, visualizados sob um aumento de 200 vezes. As imagens foram processadas pelo analisador de imagens Image J (Versão 1.45, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA) que através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas ou esverdeadas reconhece e quantifica a densidade de fibras colágenas. Foi feita uma avaliação quantitativa das fibras colágenas, obtendo-se, portanto a porcentagem de fibras colágenas na área total da cartilagem articular selecionada para análise (Vasilceac et al, 2011).

4.3.7. Avaliação imunohistoquímica do colágeno tipo II

Para essa avaliação, os cortes das articulações foram desparafinizados em xilol (Qhemis) e reidratados com álcool etílico (Qhemis) em concentrações decrescentes. Foi realizada a recuperação enzimática em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 por 5 minutos em panela a vapor (Steamer Philips Walita). Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 30 volumes (Merck) a 0,5% por 10 minutos e depois o bloqueio das ligações inespecíficas por 20 minutos soro bloqueadoras (Kit ABC Elite Vector PK-6200) com reagente específico (Kit VECTOR PK-6000). Posteriormente as lâminas foram incubadas por 30 minutos em anticorpo pr-diluido pelo fabricante específico para detecção de colágeno tipo II (Abcam 54236), para depois ser incubado novamente por 30 minutos com anticorpo secundário universal (Kit ABC Elite Vector PK-6200). Por fim as lâminas receberam o reagente ABC (Kit ABC Elite Vector PK-6200) por 30 minutos e o cromógeno por 5 minutos (DAB Substrate Kit Sk-4100). Foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (EasyPath EP-101071), desidratadas em

álcool etílico crescente, diafanizada com xilol e finalizadas por meio de montagem Permout (Fischer Scientific SP15-500). Foram feitas fotomicrografias das lâminas com os mesmos procedimentos feitos para a avaliação da densidade das fibras colágenas. Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada imagem, imagens capturadas ao longo da extensão de cada lâmina, visualizados em microscópio de luz sob um aumento de 200 vezes. Foi feita uma avaliação semi-quantitativa da expressão de colágeno tipo II, determinando o número (porcentagem) de condrócitos ou lacunas que estavam com imunomarcagem positiva em relação a todos os condrócitos/lacunas presentes no campo, sendo feita uma média dos 3 campos para cada imagem. Todas as lâminas foram avaliadas por 2 observadores cegados.

4.3.8. Análise estatística

Para a verificação da normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. Para a comparação da densidade de fibras colágenas grossas, finas e densidade total de fibras colágenas entre os grupos, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA com Post Hoc Tukey ($p \leq 0,05$). Na avaliação da expressão de colágeno tipo II, foi feita a correlação entre os dois observadores pelo teste de Spearman com $R \geq 0,8$ e $p \leq 0,05$, e para comparação da expressão de colágeno tipo II entre os grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com Post Hoc Newman Keuls ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o software estatístico *Statistic 7* (STATSOFT).

4.4. RESULTADOS

A avaliação do colágeno articular permitiu observar que nosso protocolo de exercício resistido desencadeou modificações na densidade das diferentes fibras colágenas e na expressão de colágeno tipo II em nosso modelo animal de osteoartrite (Figura 1).

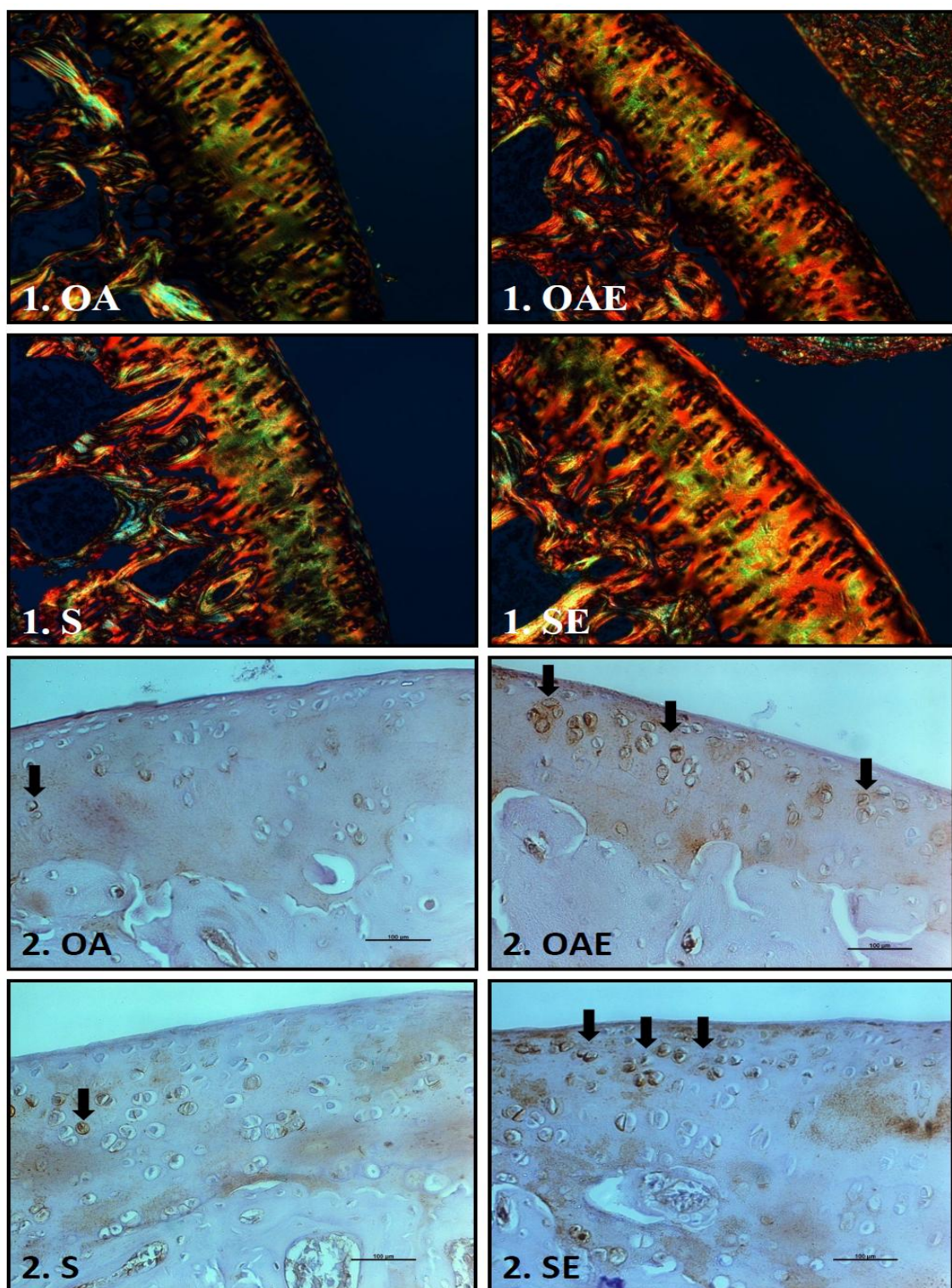


Figura 1: Fotomicrografia da cartilagem articular, coradas com Picrosirius Red (1) e imunohistoquímica para colágeno tipo II (2). Nas imagens 1.OA, 1.OAE, 1. S, 1. SE, observa-se a diferença da birrefringência (tonalidades esverdeadas e alaranjadas) das fibras de colágeno (aumento de 200 vezes); As setas nas imagens 2.OA, 2.OAE, 2.S, 2.SE apontam para os condrócitos/lacunas considerados com imunomarcagem positiva. (Barra de corresponde a 50 μ m; Aumento de 400 vezes).

4.4.1. Densidade de fibras colágenas (Figura 2)

Com relação à densidade de fibras colágenas, observamos que os grupos OAE e SE apresentaram maior densidade total de fibras colágenas em relação aos grupos que não realizaram protocolo de exercício resistido (OAE e OA $p=0,001$; OAE e S $p=0,001$; SE e OA $p=0,001$; SE e S $p=0,001$).

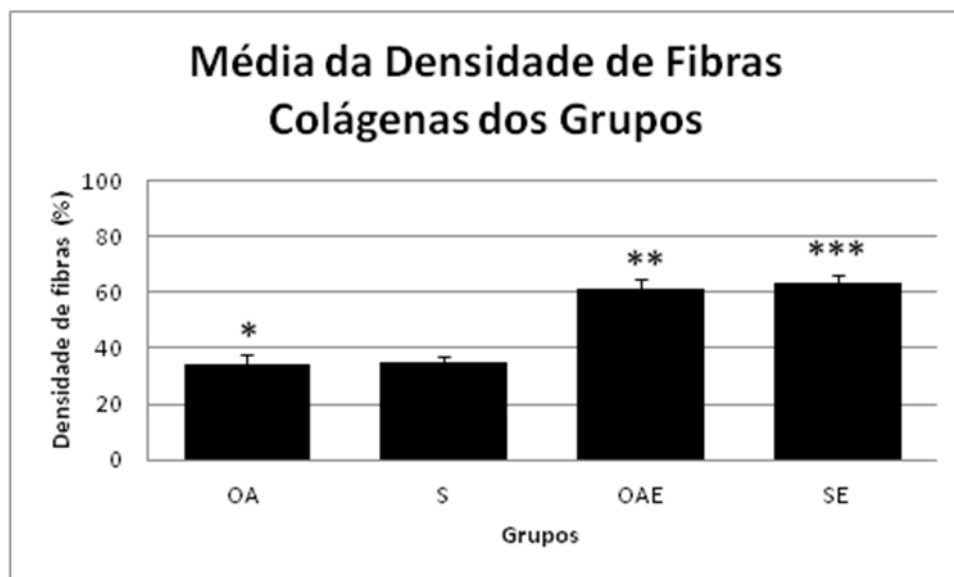


Figura 2: Representação gráfica da média da porcentagem da densidade de fibras colágenas. Os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido apresentaram maiores valores para densidade de fibras colágenas em relação aos outros grupos. *OA e OAE ($p=0,001$); OA e SE ($p=0,001$) ** OAE e S ($p=0,001$); OAE e SE ($p=0,001$) *** SE e S ($p=0,001$)

4.4.2. Imunohistoquímica para o colágeno tipo II (Figura 3)

A imunohistoquímica para o colágeno tipo II mostrou que todos os grupos apresentaram diferença em relação à expressão de colágeno tipo II (Figura 5) sendo que os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido tiveram maior expressão de colágeno tipo II que os outros grupos (OAE e OA $p=0,001$; OAE e S $p=0,001$; SE e OA $p=0,001$; SE e S $p=0,001$), o grupo SE obteve maior expressão de colágeno tipo II que o grupo OAE (SE e OAE $p=0,001$) e o grupo OA apresentou os menores valores que o grupo S ($p=0,01$) (Figura 3).

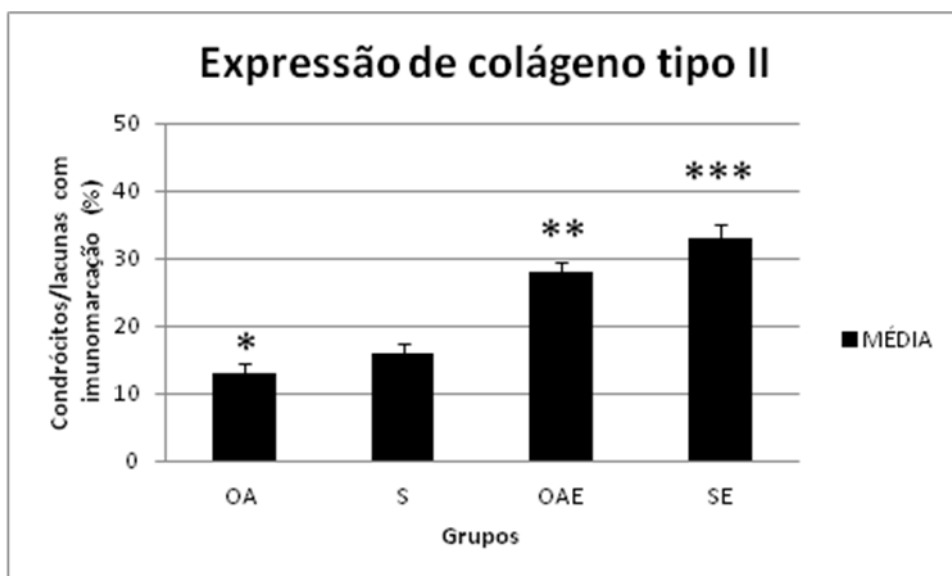


Figura 3: Representação gráfica da porcentagem de condrócitos/lacunas com imunomarcagem positiva para colágeno tipo II. Os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido apresentaram maiores valores para expressão de colágeno tipo II em relação aos outros grupos.* OA e S ($p=0,01$); ** OAE e OA ($p=0,001$), OAE e S ($p=0,001$); *** SE e OA ($p=0,001$); SE e S ($p=0,001$), SE e OAE ($p=0,001$)

4.5. DISCUSSÃO

O protocolo de exercício resistido promoveu remodelamento do colágeno articular no modelo animal de OA, sendo que a densidade de fibras colágenas e a expressão de colágeno tipo II dos grupos foram modificadas

Alguns autores relacionam os tipos de colágeno com a estrutura e formação das fibras colágenas, sendo o colágeno tipo XI o principal responsável pela formação de fibras finas, pois impede a adição de mais colágeno do tipo II, e o colágeno tipo IX responsável pela eficiência da fibrilogênese (Velosa, Teodoro, Yoshinari, 2003; Keene et al, 1995; Eyre et al, 1995). Apesar das fibras colágenas possuírem diferentes tipos de colágenos, é consenso que o colágeno tipo II é, além do mais abundante colágeno da cartilagem articular, o colágeno que forma a estrutura principal das fibras colágenas (Velosa, Teodoro, Yoshinari, 2003).

Baseado nessa relação entre o colágeno tipo II e as fibras colágenas, pode-se estabelecer a hipótese que o aumento da expressão do colágeno tipo II nos grupos exercitados refletiu no aumento da densidade total de fibras colágenas. Não temos informações suficientes para afirmar que o aumento da expressão do colágeno tipo II é diretamente proporcional ao aumento da densidade de fibras, pois existem mais tipos de colágenos que as formam, mas podemos afirmar que nossos resultados apontam que o remodelamento do colágeno ocorreu em ambas às estruturas avaliadas.

Poucos estudos têm demonstrado os efeitos do exercício em modelos animais de OA. Em estudo com modelo animal de transecção do LCA, o exercício aeróbio de intensidade moderada, aplicado por 4 semanas, reduziu a ocorrência de apoptose de condrócitos (Galois et al, 2004). Resultados positivos também foram descritos com a aplicação de 8 semanas de exercício aeróbico em animais com OA induzida por iodoacetato de sódio, sendo descrito aumento dos níveis de enzimas que atuam na defesa contra a ocorrência de estresse oxidativo e preservação do conteúdo de proteoglicanos (Cifuentes et al, 2010). Em nosso estudo obtivemos resultados satisfatórios utilizando o exercício resistido, pois os grupos que realizaram nosso protocolo apresentaram maiores quantidades de fibras colágenas e de colágeno tipo II em relação aos grupos que não foram submetidos ao protocolo de exercício resistido.

Logo, a aplicação de exercício resistido nos grupos estudados teve uma melhor resposta do que a ausência de exercício.

Diferentemente de nossos resultados, estudos sobre o efeito do exercício no colágeno articular mostraram uma diminuição no conteúdo de fibras colágenas e uma redução do colágeno no côndilo femoral de cães saudáveis submetidos a corridas extenuantes (Arokoski et al. 1996; Saamanen et al. 1994). De um modo geral, a aplicação de exercício físico ainda não é consenso na OA, pois alguns autores consideram a atividade física um fator de risco para o desenvolvimento da OA, capaz de perpetuar a degeneração já instalada (Appleton et al, 2007; Lapvetelainen et al, 2002). Porém, o que realmente é prejudicial à cartilagem são os exercícios extenuantes ou de alto impacto, que podem levar a incapacidade da articulação e desenvolvimento da doença, mas exercícios de intensidade moderada trazem benefícios para indivíduos com OA, como melhora da marcha, o equilíbrio e principalmente a força muscular. (Hunter, Eckstein, 2009; Sutton et al, 2001; Petrella, Bartha, 2000; Hurley, Scott, 1998).

Neste estudo não foi realizada avaliação da força muscular do joelho dos animais, o que pode ser considerado uma limitação de nosso estudo. Apesar desta limitação, baseado nos resultados encontrados, podemos estabelecer que o protocolo aplicado atuou na fraqueza muscular do quadríceps dos animais, aumentando a estabilidade e proteção articular, e conseqüentemente trazendo benefícios para o colágeno articular. A avaliação somente do colágeno não descarta a importância de avaliar outros constituintes da cartilagem, como condrócitos e proteoglicanos, e também outros tecidos, como sinóvia e osso subcondral. Logo, a principal contribuição desse estudo foi demonstrar que o exercício resistido é uma intervenção que pode ser utilizada no tratamento da osteoartrite e que exerce influência no colágeno presente na matriz cartilaginosa, tornando-o uma potencial intervenção a ser estudada tratamento da osteoartrite.

4.6. CONCLUSÃO

O exercício resistido promove remodelamento do colágeno articular de modelo animal de osteoartrite, atuando no controle da redução das fibras colágenas e trazendo benefícios para o tecido cartilaginoso na osteoartrite.

4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Roddy E, Zhang W, Doherty M (2005) Aerobic walking or strengthening exercise for osteoarthritis of the knee? A systematic review **Ann Rheum Dis** (64) 544-548.

Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson A, Altman RD, Arden N, Bierma-zeinstra S, et al (2008) OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines **Osteoarthritis and Cartilage** (16) 137-162

Lange AK, Vanwanseele B, Singh MAF (2008) Strength Training for Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)** (59) 1488-1494

Aigner T, Stove J (2003) Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. **Advanced Drug Delivery Reviews** (55)1569– 159.

Eyre D (2002) Collagen of articular cartilage. **Arthritis Res** (4) 30-35.

Henrotina Y, Addisonb S, Krausb V, Deberga M (2007) Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? **Current Opinion in Rheumatology** (19) 444-450.

Velosa, APP, Teodoro WR, Yoshinari NH (2003) Colágeno na cartilagem osteoartrosica. *Revista Brasileira de Reumatologia* (43) 160-166.

Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, Tchetina E, Kobayashi M, Yasuda T, et al (2003) Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. **Biochem Soc Sym** (70) 115-123.

Changoor A, Nelea M, Méthot S, Tran-Khanh N, Chevrier A, Restrepo A, et al (2011) Structural characteristics of the collagen network in human normal, degraded and repair articular cartilages observed in polarized light and scanning electron microscopies **Osteoarthritis and Cartilage** (12) 1458-1468

Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjaersgaard-Andersen P, Sandell L, et al (2008) Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage** (16) 615-623.

Ameye LG, Young MF (2006) Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the ‘Holy Grail’. **Current Opinion in Rheumatology** (18) 537-547.

Bendele AM (2001) Animal models of osteoarthritis. **J Musculoskel Neuron Interact** (4) 363-376.

Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M, et al (1998) Evidence for Altered Synthesis of Type II Collagen in Patients with Osteoarthritis. **J. Clin. Invest** (102) 2115-2125.

National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) **National Academy Press**. Washington DC, USA.

Cifuentes DJ, Rocha LG, Silva LA, Brito AC, Rueff-Barroso CR, Porto LC, et al (2010) Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis and Cartilage** (18)1088-1095.

Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-pinzano A, Cournilhenrionnet C, Loeuille D, et al (2004) Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. **Osteoarthritis and Cartilage** (12) 779-786.

Hornberger TA, Farrar RP (2008) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol** (29) 16-31.

Vasilceac FA, Renner AF, Teodoro WR, Mattiello-Rosa MG (2011) The remodeling of collagen fiber in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International** (31) 737-742.

Keene DR, Oxford JT, Morris NP (1995) Ultrastructural localization of collagen types II, IX, and XI in the growth plate of human rib and fetal bovine epiphyseal cartilage: type XI collagen is restricted to thin fibrils. **J Histochem Cytochem** (43) 967-79.

Eyre DR, Wu J-J (1995) Collagen structure and cartilage matrix integrity. **J Rheumatol** (43) 82-5.

Blaschke UK, Eikenberry EF, Hulmes DJS, Galla HJ, Bruckner P (2000) Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. **J Biol Chem** (275) 10370-8.

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 Research & Therapy** 9-13

Lapvetelainen T, Hyttinen MM, Saamanen AM, Langsjo T, Sahlman J, Felszeghy S, et al (2002) Lifelong voluntary joint loading increases osteoarthritis in mice housing a deletion mutation in type II procollagen gene, and slightly also in non-transgenic mice. **Ann Rheum Dis** (61) 810-817.

Hunter DJ, Eckstein F (2009) Exercise and osteoarthritis *J. Anat* (214) 197-207.

Sutton AJ, Muir KR, Mockett S, Fentem P (2001) A casecontrol study to investigate the relation between low and moderate levels of physical activity and osteoarthritis of

the knee using data collected as part of the Allied Dunbar National Fitness Survey. **Ann Rheum Dis** (60) 756-764.

Petrella RJ, Bartha C (2000) Home based exercise therapy for older persons with knee osteoarthritis: a randomized clinical trial. **J Rheumatol** (27) 2215-2221.

Hurley MV, Scott DL (1998) Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. **Br J Rheumatol** (37) 1181-1187.

Lewek MD, Rudolph KS, Snyder-Mackler L (2004) Quadriceps femoris muscle weakness and activation failure in patients with symptomatic knee osteoarthritis. **J Orthop Res** (22) 110-115.

Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, et al (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur J Appl Physiol** (88) 50-60.

Petterson SC, Mizner RL, Stevens JE, Rasis L, Bodenstab A, Newcomb W, et al (2009) Improved function from progressive strengthening interventions after total knee arthroplasty: a randomized clinical trial with an imbedded prospective cohort. **Arthritis Rheum** (61)174-183.

Bennell K, Hinman R (2005) Exercise as a treatment for osteoarthritis **Current Opinion in Rheumatology** (17) 634-640.

Aroskoki JPA, Hyttinen MM, Lapvetelainen T, Takács P, Kosztaczky 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.

Saamamen AM, Kiviranta I, Jurvelin J, Helminen HJ, Tammi M (1994) Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. **Connect Tissue Res** (30) 191-201.

5. ESTUDO II

EXERCÍCIO RESISTIDO MODIFICA O CONTEÚDO DE CONDRÓCITOS, PROTEOGLICANOS E FIBRONECTINA DA CARTILAGEM ARTICULAR DE MODELO ANIMAL DE OSTEOATRITE

VASILCEAC, FA¹; CARVALHO, MS¹; MATTIELLO, SM¹.

¹ Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar os condrócitos, proteoglicanos e fibronectina da cartilagem articular de modelo animal de osteoartrite submetido à aplicação de um protocolo de exercício resistido.

Material e Métodos: Trinta e seis ratos foram divididos em 6 grupos: Controle (C), Exercício (E), Modelo animal de osteoartrite (OA), Sham (S), Modelo animal de osteoartrite e exercício (OAE), Sham e Exercício (SE). Os animais dos grupos OA e OAE foram submetidos à cirurgia de transecção do LCA do joelho esquerdo e os grupos S e SE receberam o mesmo procedimento cirúrgico, entretanto sem a transecção do ligamento. Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram livres na gaiola por 2 semanas. Depois desse período, os grupos E, OAE e SE foram submetidos a 8 semanas do protocolo de exercício resistido. Ao final do experimento, as articulações do joelho de todos os animais foram coletadas, processadas em parafina e confeccionadas lâminas histológicas de cada articulação. As lâminas foram coradas com Safranina para a avaliação pelo sistema de graduação de Mankin, com Hematoxilina para a morfometria da densidade de condrócitos, e foi realizado imunohistoquímica para a avaliação da expressão de sulfato de condroitina e fibronectina.

Resultados: Os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido, SE e OAE, apresentaram menor pontuação para o sistema de graduação de Mankin, densidade de condrócitos e expressão de sulfato de condroitina e fibronectina. O grupo E apresentou maior pontuação na avaliação de suas células no sistema de graduação de Mankin, maior densidade de condrócitos e maior expressão de fibronectina quando comparado ao grupo C

Conclusão: Portanto, o protocolo de exercício resistido utilizado em nosso estudo exerce influência nos produtos da matriz extracelular, modificando o conteúdo de condrócitos, proteoglicanos e fibronectina em nosso modelo animal de osteoartrite

PALAVRAS-CHAVES: Cartilagem; Osteoartrite; Exercício; Proteoglicanos; Condrócitos; Fibronectina

5.1. INTRODUÇÃO

A fraqueza muscular do quadríceps tem relação direta com as alterações degenerativas na OA de joelho, e sabe-se que independente do tempo, uma vez desenvolvida a doença, esse déficit muscular irá acelerar o processo de degeneração (Youseffy et al, 2007; Herzog et al, 2007). Logo, o treinamento de força muscular está indicado para o tratamento de indivíduos com OA de joelho (Lange et al, 2008; Roddy et al, 2005), pois visa restaurar a força e o trofismo do quadríceps, ajudando a proteger e prevenir a articulação da perpetuação da doença (Lange et al, 2008). Além do que, a cartilagem articular quando submetida à aplicação de carga, mostra alterações como sinalização celular e biosíntese das macromoléculas da matriz extracelular (Li et al, 2003; Szafranki et al, 2004).

Também já foi descrito que o exercício físico exerce influência sob algumas estruturas presentes na cartilagem articular, como redução da atividade apoptótica de condrócitos (Galois et al, 2004), manutenção do conteúdo dos proteoglicanos (Kawac et al, 2008), e aumento de fragmentos de fibronectina (Murray et al, 2000). Destaca-se que na OA essas macromoléculas comportam-se de formas diferentes, sendo que os condrócitos se multiplicam na tentativa de reparação da lesão, porém esse aumento é transitório, predominando posteriormente a ação das proteases, conseqüentemente morte celular e degeneração cartilaginosa (Martel-Pelletier et al, 2008; Ackermann & Steinmeyer, 2005). As proteoglicanas rompem-se da estrutura do grande agregado de proteoglicanas, comprometendo a característica hidrofílica da cartilagem e reduzindo a resistência a aplicação de cargas na articulação (Martel-Pelletier et al, 2008; Arokoski et al, 2000). E por fim, o acúmulo da fibronectina na OA é descrito como prejudicial ao tecido, pois está relacionado a efeitos deletérios, como alterações no fenótipo dos condrócitos, modificação no tipo de colágeno sintetizado e atividade aumentada das metaloproteinases (ZACK et al, 2006)

Portanto, apesar das alterações dos constituintes cartilaginosos na OA estarem elucidadas na literatura, ainda não há consenso sobre o efeito do exercício sobre essas estruturas, pois dependendo do tipo de exercício e da intensidade, sua aplicação pode ser considerada prejudicial ou benéfica para o tecido (Appleton et al, 2007; Roddy et al, 2005; Lapvetelainen et al, 2002). (Hunter, Eckstein, 2009; Sutton et al, 2001; Petrella,

Bartha, 2000; Hurley, Scott, 1998). Nossa hipótese é que o exercício resistido atue nos constituintes da cartilagem articular, modificando seu comportamento na OA de forma que beneficie a cartilagem articular. Diante disso, um estudo que avalie os condrócitos, proteoglicanos e fibronectina da cartilagem articular de modelo animal de osteoartrite submetido à aplicação de um protocolo de exercício resistido faz-se necessário para uma melhor compreensão do exercício como forma de reabilitação na OA.

5.2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar os condrócitos, proteoglicanos e fibronectina da cartilagem articular de modelo animal de OA submetido à aplicação de um protocolo de exercício resistido

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Animais

Foram utilizados 36 ratos machos *Wistar* (300 ± 10 g) do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, que permaneceram agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso a água e ração. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar), com as condições ambientais controladas (luminosidade: ciclo de 12h claro/escuro). O experimento foi conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996) e o projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Parecer CEA/UFSCar n° 021/2010).

5.3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos: Controle (C), Modelo de osteoartrite (OA), Sham (S), Exercício (E), Modelo de osteoartrite e Exercício (OAE), Sham e Exercício (SE). Os animais dos grupos OA e OAE foram submetidos à cirurgia de transecção do LCA do joelho esquerdo e os grupos S e SE receberam o mesmo procedimento cirúrgico, entretanto sem a transecção do ligamento. Os animais ficaram em livre deambulação nas gaiolas por duas semanas após a cirurgia, posteriormente os grupos E, OAE e SE iniciaram o protocolo de exercício resistido, três vezes por semana, durante oito semanas. Os grupos C, OA e S permaneceram livres em deambulação no mesmo período do protocolo de exercício resistido. Ao final do experimento, totalizando 10 semanas, todos os animais foram sacrificados.

5.3.3. Modelo animal de osteoartrite

A cirurgia de transecção do LCA foi realizada com os animais anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 20 mg/Kg/peso corporal e ketamina 90 mg/Kg/peso corporal), seguindo as recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996). A cirurgia foi realizada no joelho esquerdo. Previamente a cirurgia, os joelhos dos animais foram tricotomizados e realizada incisão de aproximadamente 1cm na região medial do joelho. Posteriormente a patela foi deslocada medialmente e o joelho flexionado a fim de expor o LCA. Com tesoura

oftálmica o LCA foi seccionado. Posteriormente, a patela foi recolocada e os tecidos foram suturados (Galois et al, 2004). Um teste de gaveta anterior positivo validou a transecção do LCA. Destaca-se que os animais do grupo S e SE receberam os mesmo procedimentos descritos anteriormente, entretanto o LCA foi mantido íntegro.

5.3.4. Protocolo de exercício resistido

Os animais escalaram uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com uma carga presa em suas caudas (Hornberg, Farrar, 2004). O aparato de carga foi preso a porção proximal da cauda do animal com uma fita-adesiva (Micropore®). No topo da escada os animais alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm), como apoio.

O protocolo de exercício resistido foi adaptado de Hornberger, Farrar (2004). No primeiro dia do protocolo foi calculada a carga de resistência máxima inicial (RMI) cada animal. Foi feita uma escalada inicial com 50% do peso corporal do animal (± 150 g), depois foi adicionado uma carga de 10% do peso corporal do animal (± 30 g) até o mesmo interromper a subida. Foi interrompido quando o animal permanecia mais de 30s parado ou quando escorregava. A RMI foi determinada pela última carga que o animal conseguiu realizar uma escalada completa.

Os animais faziam 10 escaladas por sessão com 30 segundos de intervalo entre cada escalada, 3 sessões por semana em dias alternados por um período total de 8 semanas. A carga do protocolo de exercício resistido foi progressiva, na seguinte evolução: 1^a e 2^a semana 50% da RMI, semanas 3 e 4 com 75% da RMI, 5^a e 6^a semana 90% da RMI, 7 e 8 semanas com 100% da RMI. Dois dias antes de iniciar o protocolo, os animais realizaram um protocolo de familiarização, entretanto sem carga. Os animais que não se adaptaram à familiarização foram excluídos. Não foi realizado qualquer estímulo nocivo para o animal realizar a escalada.

5.3.5. Processamento histológico das articulações

Após o sacrifício dos animais, os joelhos esquerdos foram removidos e desarticulados, separando para o estudo o côndilo femoral de cada articulação, que posteriormente foi fixado em Formol a 10% por 3 dias e submetido à descalcificação em Ácido Nítrico a 7,5%, acrescido de glicerina na mesma concentração durante aproximadamente 10 dias. Esse material foi processado em parafina e emblocado,

obtendo-se um bloco para cada côndilo femoral. Posteriormente, cada bloco foi cortado no plano sagital em Micrótomo (LEICA[®], Alemanha), sendo selecionado o côndilo femoral medial para a avaliação. Os 30 primeiros cortes de 6 µm foram descartados, e a partir da, cortes de 6µm foram selecionados para a montagem das lâminas.

5.3.6. Avaliação da densidade de condrócitos

Para a avaliação da densidade de condrócitos, as lâminas foram coradas com Hematoxilina (EasyPath EP-101071). Foram capturadas fotomicrografias das lâminas confeccionadas, sendo utilizado o software Axion Vision Image Analysis 4.1 (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Foram feitas fotomicrografias das lâminas por meio de um microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75, Tokyo, Japão). Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada imagem capturadas ao longo da extensão de cada lâmina, visualizados sob um aumento de 200 vezes. Os condrócitos foram contados manualmente por meio do pelo analisador de imagens Image J (Versão 1.45, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA).

5.3.7. Avaliação pelo sistema de graduação de Mankin

Para a avaliação histológica da cartilagem articular foram avaliadas as lâminas coradas com Safranina (Sigma S2255). A avaliação foi feita por 2 avaliadores cegados por meio de um microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), utilizando o Sistemas de graduação Histológicas-Histoqumicas para cartilagem articular de Mankin et al (1971), podendo ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Sistema de graduação de Mankin

1. Estrutura	
Normal	0
Irregularidades na superfície	1
Fibrilações e irregularidades na superfície	2
Fissuras na camada superficial	3
Fissuras na camada média	4
Fissuras na camada profunda	5
Completa desorganização	6
2. Células	
Normal	0
Hiper celularidade difusa	1
Clones	2
Hipo celularidade	3
3. Coloração por Safranina	
Normal	0
Redução leve	1
Redução moderada	2
Redução intensa	3
Corante não observado	4
4. Integridade da tidemark	
Intacta	0
Descontínua	1

5.3.8. Avaliação da expressão de sulfato de condroitina e fibronectina

Para essa avaliação, todas as lâminas receberam os mesmos procedimentos, com exceção da incubação em anticorpo primário específico para cada avaliação. Os cortes das articulações foram desparafinizados em xilol (Qhemis) e reidratados com álcool etílico (Qhemis) em concentrações decrescentes. Foi realizada a recuperação enzimática em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 por 5 minutos em panela a vapor (Steamer Philips Walita). Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 30 volumes (Merck) a 0,5% por 10 minutos e depois o bloqueio das ligações inespecíficas por 20 minutos soro bloqueadoras (Kit ABC Elite Vector PK-6200) com reagente específico (Kit VECTOR PK-6000). Posteriormente, para a avaliação da expressão de sulfato de condroitina, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em anticorpo primário específico para detecção de sulfato de condroitina (Abcam 78689) na diluição 1:50.000. Para a avaliação da expressão de fibronectina, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em anticorpo primário específico para a detecção de fibronectina (Dako A0245) na diluição

1:400. Após esse procedimento feito separadamente, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário universal (Kit ABC Elite Vector PK-6200). Por fim as lâminas receberam o reagente ABC (Kit ABC Elite Vector PK-6200) por 30 minutos e o cromógeno por 5 minutos (DAB Substrate Kit Sk-4100). Foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (EasyPath EP-101071), desidratadas em álcool etílico crescente, diafanizada com xilol e finalizadas por meio de montagem Permount (Fischer Scientific SP15-500). Foram feitas fotomicrografias das lâminas por meio de um microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75, Tokyo, Japão). Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada imagem, imagens capturadas ao longo da extensão de cada lâmina, visualizados em microscópio de luz sob um aumento de 200 vezes. Foi feita uma avaliação semi-quantitativa da expressão de sulfato de condroitina e fibronectina, determinando o número (porcentagem) de condrócitos ou lacunas que estavam com imunomarcagem positiva em relação a todos os condrócitos/lacunas presentes no campo, sendo feita uma média dos 3 campos para cada imagem. Todas as lâminas foram avaliadas por 2 observadores cegados.

5.3.9. Análise estatística

Para a verificação da normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. Foi feita a correlação entre os dois observadores pelo teste de Spearman com $R \geq 0,8$ e $p \leq 0,05$. Para a comparação da densidade de condrócitos e da pontuação do sistema de graduação de Mankin, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA com Post Hoc Tukey ($p \leq 0,05$). Para a comparação da expressão de sulfato de condroitina e fibronectina, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com Post Hoc Newman Keuls ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o software estatístico *Statistic 7* (Statsoft).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Sistema de graduação de Mankin

Nossos resultados apontam que o protocolo de exercício resistido utilizado proporcionou modificações nos constituintes cartilagosos avaliados (Figura 1).

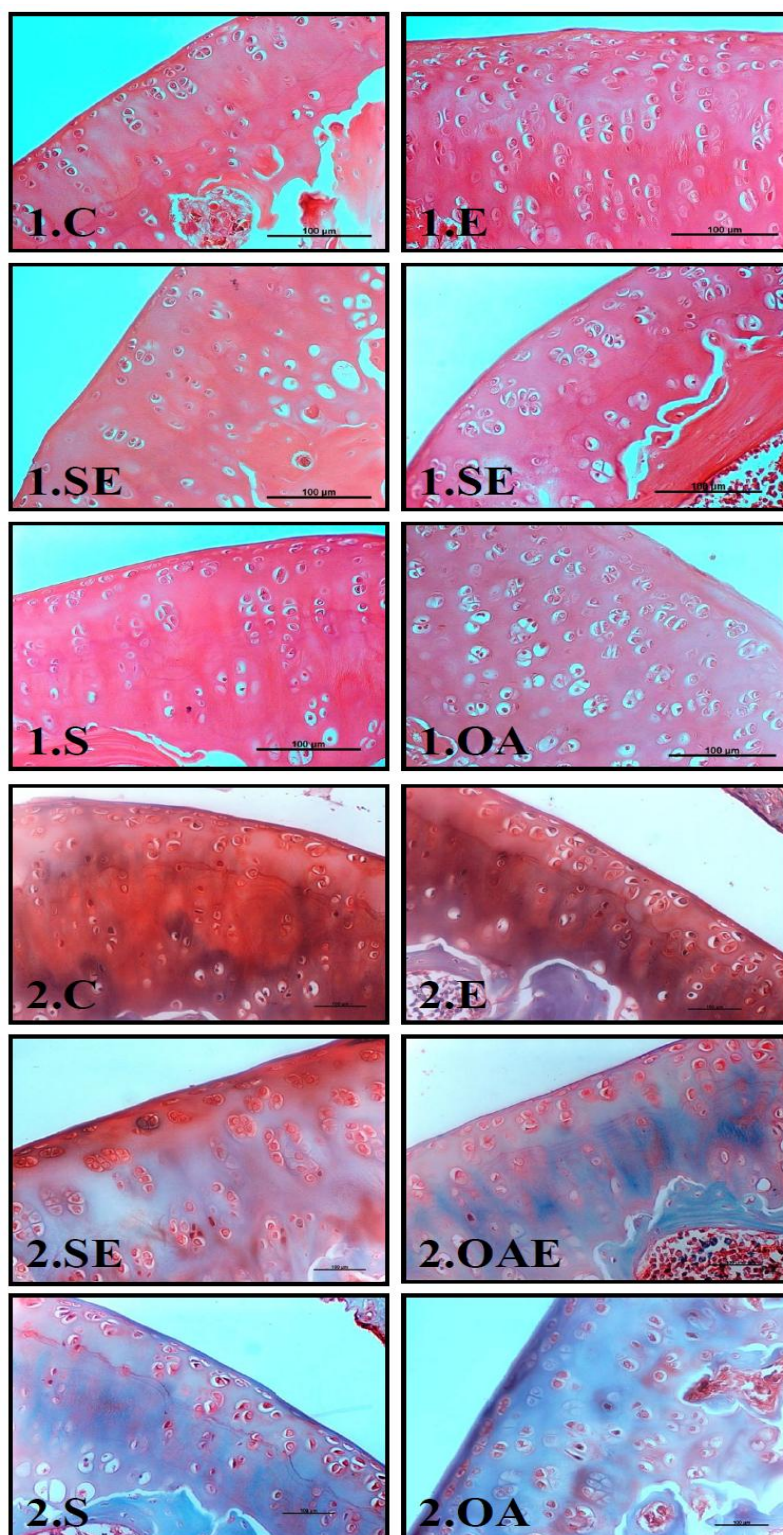


Figura 1: Fotomicrografia da cartilagem articular coradas com Hematoxilina (1) e Safranina (2). Pode-se observar um discreto aumento na densidade de condrócitos nas imagens 1.E; 1.S e 1.OA (Barra de aumento = 100µm; Aumento de 400 vezes); Em relação à intensidade da Safranina, as imagens 2.C e 2.E são consideradas normais, 2.SE com leve redução em até metade da área total, 2.OAE com redução leve em toda a extensão, 2.S com redução intensa em até metade da área total e 2.OA com redução intensa em toda extensão (Barra de aumento = 50; Aumento de 400 vezes)

O grupo C apresentou a menor pontuação para todos os itens do sistema de graduação de Mankin. De uma forma geral, os grupos submetidos ao protocolo de exercício resistido, OAE e SE, apresentaram uma menor pontuação para o sistema de graduação de Mankin do que seus correspondentes que não realizaram o exercício, OA e S, sendo que esses dois últimos apresentaram as maiores pontuações do Mankin em comparação a todos os outros grupos. O grupo E somente apresentou diferença de pontuação significativa em relação ao grupo C na avaliação das células (Figura 2).

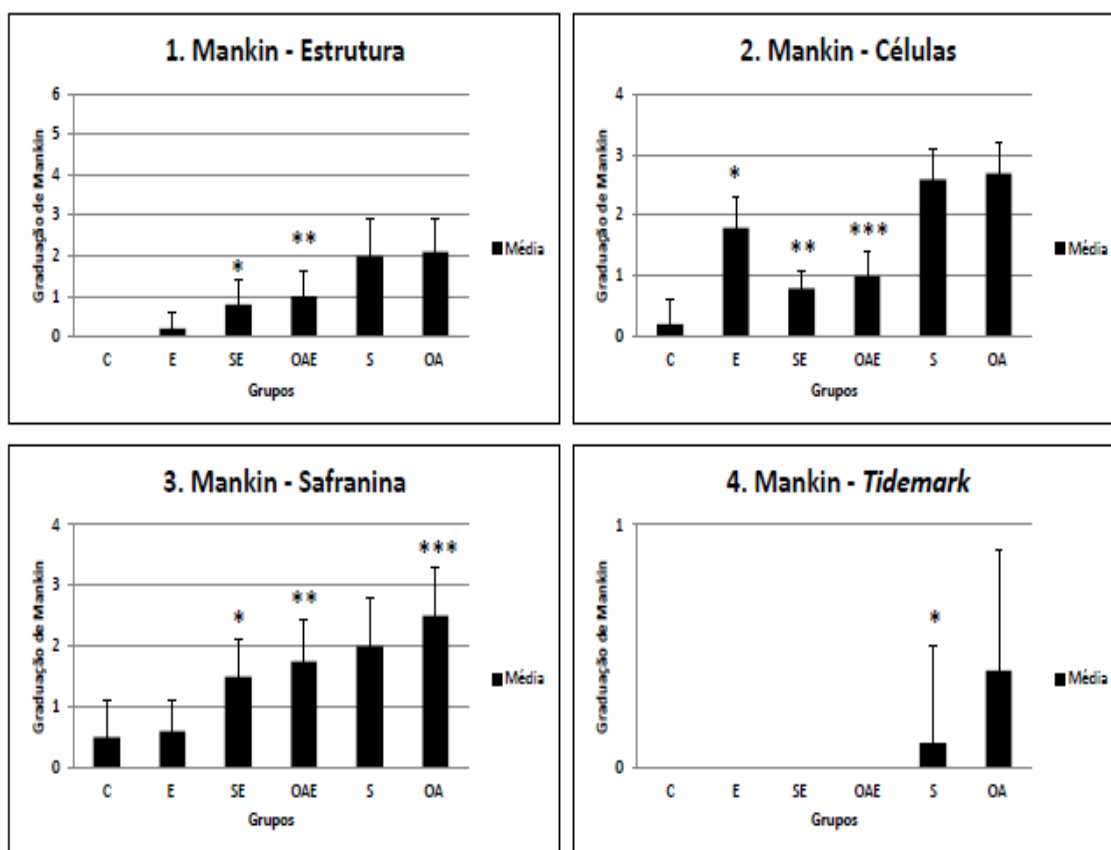


Figura 2. Representação gráfica do sistema de graduação de Mankin, separado por itens: **1. Mankin – Estrutura** *SE e S ($p=0,001$) SE e OAE $p=0,001$; **OAE e S ($p=0,001$); OAE e OA ($p=0,001$); **2. Mankin – Células** *E e C ($p=0,001$); E e SE ($p=0,005$); E e OA ($p=0,01$); ** SE e S ($p=0,001$); SE e OA ($p=0,001$); *** OAE e S ($p=0,001$); OAE e OA ($p=0,001$); **3. Mankin – Safranina** *SE e OAE ($p=0,01$); SE e S ($p=0,001$); SE e OA ($p=0,001$); ** OAE e S ($p=0,02$); OAE e OA ($p=0,001$) *** OA e S ($p=0,002$); **4. Mankin – Tidemark** *OA e S ($p=0,01$).

5.4.2. Densidade de condrócitos

O grupo C apresentou os menores valores para densidade de condrócitos e o grupo E apresentou maiores valores para densidade de condrócitos em relação aos grupos SE e OAE e menores valores em relação aos grupos S e OA. Já os grupos SE e OAE apresentaram menores valores para densidade de condrócitos que os grupos S e OA (Figura 3).

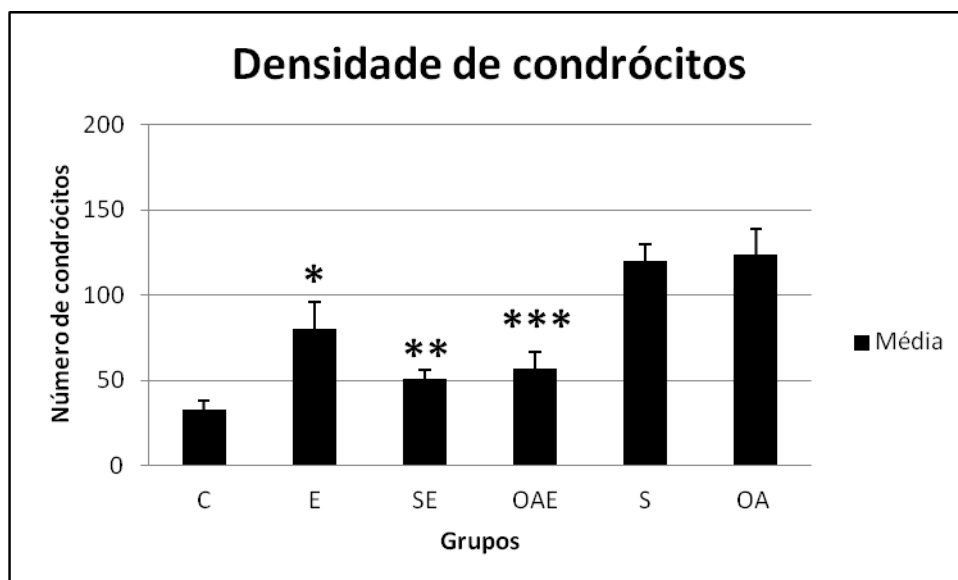


Figura 3. Representação gráfica da densidade de condrócitos: *E e C ($p=0,001$); E e SE ($p=0,005$); E e OAE ($p=0,005$); ** SE e S ($p=0,001$); SE e OA ($p=0,001$) *** OAE e S ($p=0,001$); OAE e OA ($p=0,001$).

5.4.3. Expressão de sulfato de condroitina e fibronectina

Nossos resultados demonstraram que o exercício resistido modificou expressão de sulfato de condroitina e fibronectina (Figura 4)

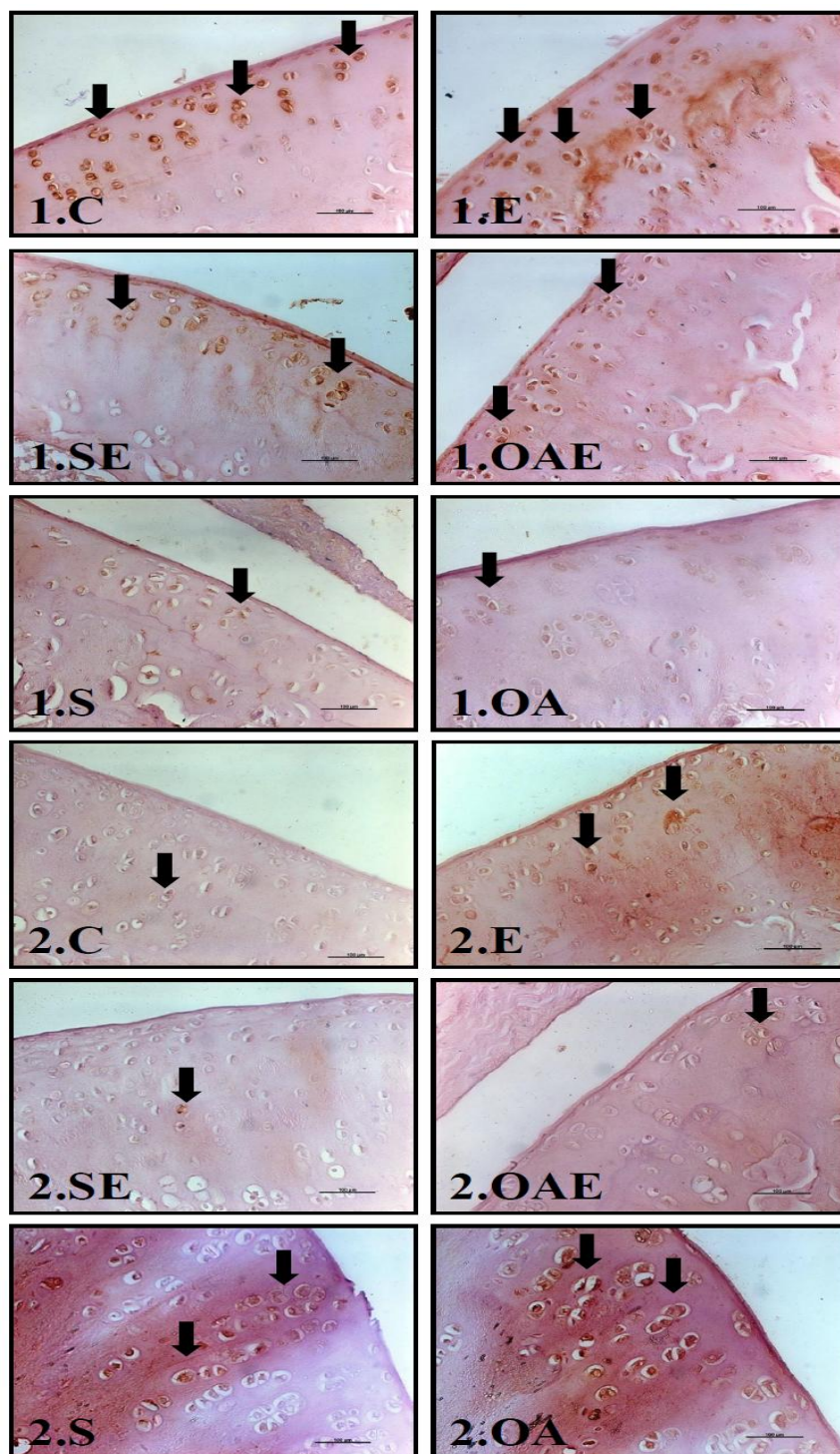


Figura 4: Fotomicrografia da cartilagem articular com imunohistoquímica para expressão de sulfato de condroitina (1) e fibronectina (2). Pode-se observar (*setas*) uma alta expressão de sulfato de condroitina nas imagens 1.C e 1.E, e uma maior expressão nas imagens 1.SE e 1.OAE quando comparados as imagens 1.S e 1.OA (Barra de aumento = 100 μ m; Aumento de 400 vezes); Em relação à expressão de fibronectina, observa-se (*setas*) uma considerável expressão nas imagens 2.E, 2.S e 2.OA e uma discreta expressão nos grupos 2.C, 2.SE e 2.OAE. (Barra de aumento = 100 μ m; Aumento de 400 vezes).

Na avaliação da expressão de sulfato de condroitina, os grupos C e E apresentaram os maiores valores para a expressão dessa molécula quando comparados a todos os outros grupos e os grupos SE e OAE apresentaram maiores valores que os grupos S e OA (Figura 5).

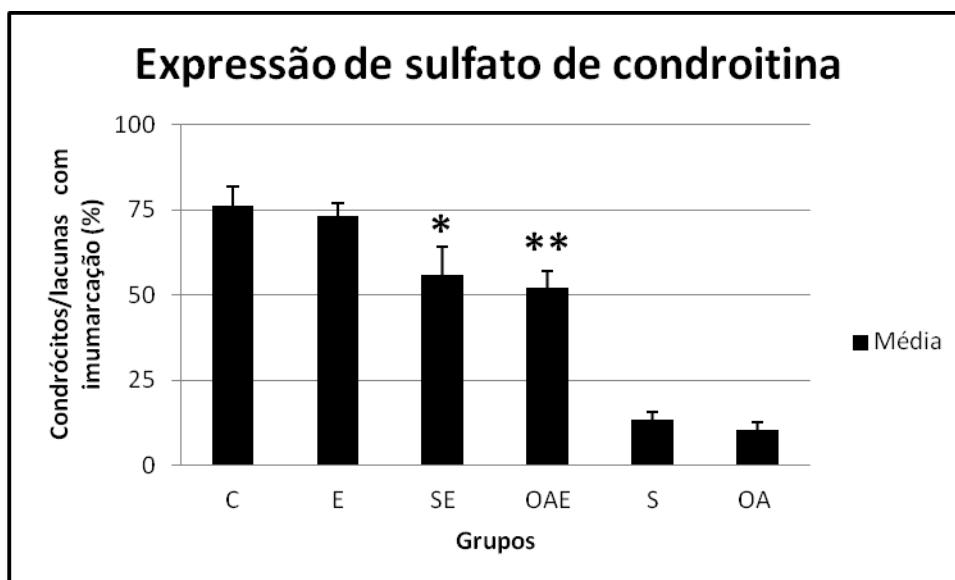


Figura 5. Representação gráfica da expressão sulfato de condroitina: *SE e S (p=0,001); SE e OA (p=0,001) ** OAE e S (p=0,001); OAE e OA (p=0,001).

Já em relação à expressão de fibronectina, obtivemos resultados diferentes. O grupo E apresentou maiores valores em relação aos grupos C, SE e OAE. Já os grupos SE e OAE apresentaram novamente maiores valores em relação aos grupos S e OA (Figura 6).

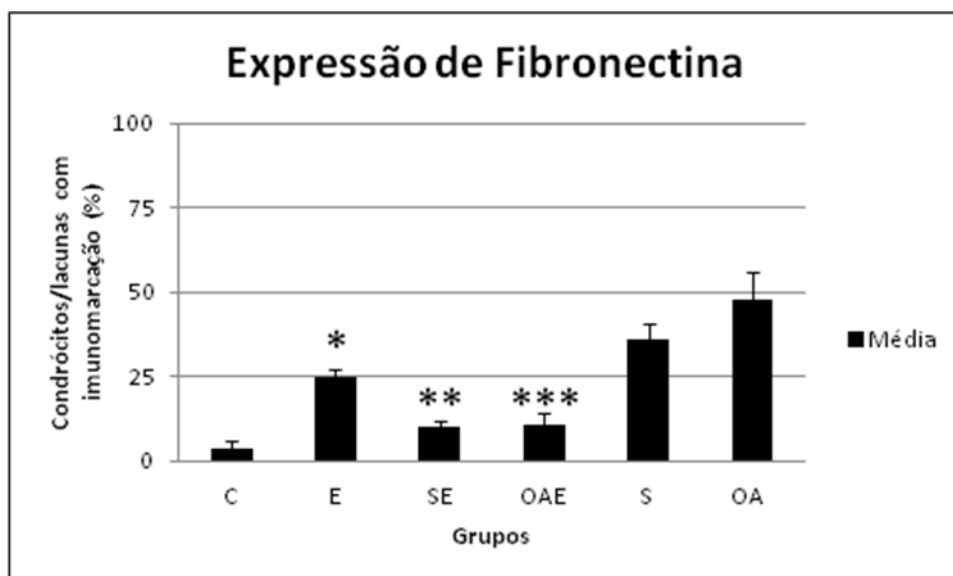


Figura 6. Representação gráfica da expressão de fibronectina: *E e C ($p=0,001$); E e SE ($p=0,005$); E e OAE ($p=0,005$) **SE e S ($p=0,001$); SE e OA ($p=0,001$) ** OAE e S ($p=0,001$); OAE e OA ($p=0,001$).

5.5. DISCUSSÃO

Nossos resultados indicaram que o protocolo de exercício resistido exerce influência no comportamento dos constituintes cartilagosos, modificando seu conteúdo tanto em nosso modelo animal de osteoartrite quanto nos animais saudáveis.

Ao avaliarmos nosso modelo animal de osteoartrite, verificamos que ele apresentou as alterações histológicas da OA descritas na literatura, pois na OA o processo é iniciado pela perda de proteoglicanos da matriz extracelular e aumento dos mecanismos de síntese dos condrócitos, e com a matriz extracelular fragilizada, aumenta-se a expressão de fibronectina e os condrócitos ficam expostos a ação de proteases, facilitando a progressão da doença (Martel-Pelletier et al, 2008; Ackermann, Steinmeyer, 2005; Ikenoue et al, 2003). Porém quando submetemos os grupos ao exercício resistido, essas alterações características da OA foram reduzidas, demonstrando que a aplicação de exercício resistido nos grupos estudados teve uma melhor resposta do que a não aplicação do exercício.

Não há na literatura estudos que avaliaram a cartilagem articular de modelo animal de osteoartrite frente ao exercício resistido. Em estudos com modelos animais de OA, já foi descrito o benefício do exercício aeróbico na redução da ocorrência de apoptose de condrócitos (Galois et al, 2004) e na defesa contra a ocorrência de stress oxidativo (Cifuentes et al, 2010). De um modo geral, está sendo observado que o exercício é capaz de atenuar as alterações degenerativas da OA, mas o que precisa ser mais bem elucidado é qual tipo de atividade deve ser recomendada.

No estudo do exercício resistido na OA, a dificuldade está no consenso de um protocolo ideal. Nosso protocolo foi adaptado de um estudo que investigou alterações musculares em animais saudáveis (Hornberg & Farrar 2004), não tendo relação nenhuma com osteoartrite, somente com hipertrofia muscular de forma geral, porém foi por meio de estudos de exercício em humanos, com recomendações para a utilização de cargas progressivas, de intensidade moderada e intervalos de mais de um dia entre as sessões, que chegamos a nosso protocolo (Pettersson et al 2009; Campos et al, 2002). Apesar de não podemos afirmar que nosso protocolo benéfico para a cartilagem articular, podemos estabelecer que sua aplicação modifica alguns dos constituintes da matriz extracelular, reduzindo as alterações presentes na OA.

Uma possível explicação para a resposta positiva da cartilagem frente ao

exercício é possível aumento de força da musculatura do quadríceps dos animais, que aumentou a estabilidade articular e reduziu o tempo de evolução da doença. Uma das principais complicações da osteoartrite é a fraqueza da musculatura do quadríceps, que acarreta em prejuízo na estabilidade articular e conseqüentemente colabora para a progressão da doença (Lange et al, 2009). Logo, o incremento de força através do nosso protocolo de exercício resistido minimizou a fraqueza da musculatura anterior do joelho e conseqüentemente suas complicações. Apesar de atribuirmos o resultado positivo ao ganho de força, não podemos garantir essa relação, pois não fizemos a mensuração da força muscular do animal, antes ou após o experimento, sendo essa uma possível limitação do nosso estudo.

Os grupos submetidos à falsa cirurgia apresentaram praticamente os mesmos resultados que nosso modelo animal de OA. Possivelmente o extravasamento do líquido articular durante a incisão cirúrgica desencadeou um estímulo irritativo local, estimulando principalmente os sinoviócitos a sintetizar citocinas como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), que estimularam os condrócitos a sintetizar e secretar proteases, iniciando todo o processo lesivo na OA (Martel-Pelletier, 2004; Goldring et al 2004). Já foi descrito na literatura que a IL-1 e o TNF são mediadores da degeneração da cartilagem, principalmente no início da OA (Goldring 2000). Apesar de nosso modelo de OA estar consolidado na literatura (Ameye & Young, 2006; Bendele, 2001; Kaab et al, 2000), pode ser também que uma técnica cirúrgica diferente para a transecção do LCA, com menor incisão ou menor laceração de tecidos, não desencadeie esse estímulo inflamatório local, gerando resultado diferente do obtido por nós. A mensuração dessas citocinas citadas pode ser considerada uma limitação do estudo, pois sua avaliação provavelmente responderia as questões relacionadas com o modelo utilizado.

Os animais saudáveis que foram submetidos ao exercício resistido apresentaram aumento na densidade de condrócitos e expressão da fibronectina, resultados que aproximam esse grupo do nosso modelo animal de OA. Como somente houve essas alterações descritas, sendo que os proteoglicanos, estrutura, tidemark da cartilagem e expressão de sulfato de condroitina apresentaram valores próximos ao grupo controle, pode-se estabelecer que essas os condrócitos e a fibronectina encontrados em maior conteúdo nesses grupos não necessariamente iniciariam os mecanismos lesivos que levam a instalação da OA.

A avaliação da cartilagem articular na OA não exclui importância da avaliação de outros tecidos da articulação, como osso subcondral, ligamentos, meniscos, tendão e músculos, pois já foi descrito na literatura o envolvimento dessas estruturas no processo lesivo da OA. Logo, a principal contribuição desse estudo foi demonstrar que o exercício resistido é uma intervenção que pode ser utilizada no tratamento da osteoartrite, pois teve a capacidade de modificar o comportamento de diferentes macromoléculas da cartilagem articular.

5.6 CONCLUSÃO

O protocolo de exercício resistido influenciou no comportamento dos principais constituintes da cartilagem articular em processo de degeneração, modificando o comportamento das proteoglicanas, condrócitos e fibronectina e reduzindo as alterações da osteoartrite.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Herzog W, Longinob D (2007) The role of muscles in joint degeneration and osteoarthritis. **Journal of Biomechanics** 40: 54–63.

Youssefy AR, Longinob D, Seerattany R, Leonardy T, Herzog W (2009) Muscle weakness causes joint degeneration in rabbits. **Osteoarthritis and Cartilage** 17:1228-1235.

Lange AK, Vanwanseele B, Singh MAF (2008) Strength Training for Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)** (59) 1488-1494.

Roddy E, Zhang W, Doherty M (2005) Aerobic walking or strengthening exercise for osteoarthritis of the knee? A systematic review **Ann Rheum Dis** (64) 544-548.

Zack MD; Arner, EC, Anglin MD, Alston JT; Malfait AM, Tortorella MD. (2006) Identification of fibronectin neoepitopes. **Arthritis Rheum**, v. 54, p. 2912-2922, 2006.

Chevalier X (1993) Fibronectin, Cartilage, and Osteoarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 122, p. 307-318.

Guo D, Ding L, Homandberg GA (2009) Telopeptides of type II collagen upregulate proteinases and damage cartilage but are less effective than highly active fibronectina fragments. **Inflamm Res**, v. 58, p. 161–169.

Cifuentes DJ, Rocha LG, Silva LA, Brito AC, Rueff-Barroso CR, Porto LC, et al (2010) Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarthritis and Cartilage** (18)1088-1095.

Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-pinzano A, Cournilhenrionnet C, Loeuille D, et al (2004) Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. **Osteoarthritis and Cartilage** (12) 779-786.

Changoor A, Nelea M, Méthot S, Tran-Khanh N, Chevrier A, Restrepo A, et al (2011) Structural characteristics of the collagen network in human normal, degraded and repair articular cartilages observed in polarized light and scanning electron microscopies **Osteoarthritis and Cartilage** (12) 1458-1468

Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjaersgaard-Andersen P, Sandell L, et al (2008) Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage** (16) 615-623.

Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M, et al (1998) Evidence for Altered Synthesis of Type II Collagen in Patients with Osteoarthritis. **J. Clin. Invest** (102) 2115-2125.

National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) **National Academy Press**. Washington DC, USA.

Hornberger TA, Farrar RP (2008) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol** (29) 16-31.

Vasilceac FA, Renner AF, Teodoro WR, Mattiello-Rosa MG (2011) The remodeling of collagen fiber in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International** (31) 737-742.

Keene DR, Oxford JT, Morris NP (1995) Ultrastructural localization of collagen types II, IX, and XI in the growth plate of human rib and fetal bovine epiphyseal cartilage: type XI collagen is restricted to thin fibrils. **J Histochem Cytochem** (43) 967-79.

Eyre DR, Wu J-J (1995) Collagen structure and cartilage matrix integrity. **J Rheumatol** (43) 82-5.

Blaschke UK, Eikenberry EF, Hulmes DJS, Galla HJ, Bruckner P (2000) Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. **J Biol Chem** (275) 10370-8.

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 Research & Therapy** 9-13

Lapvetelainen T, Hyttinen MM, Saamanen AM, Langsjo T, Sahlman J, Felszeghy S, et al (2002) Lifelong voluntary joint loading increases osteoarthritis in mice housing a deletion mutation in type II procollagen gene, and slightly also in non-transgenic mice. **Ann Rheum Dis** (61) 810-817.

Hunter DJ, Eckstein F (2009) Exercise and osteoarthritis *J. Anat* (214) 197-207.

Sutton AJ, Muir KR, Mockett S, Fentem P (2001) A casecontrol study to investigate the relation between low and moderate levels of physical activity and osteoarthritis of the knee using data collected as part of the Allied Dunbar National Fitness Survey. **Ann Rheum Dis** (60) 756-764.

Petrella RJ, Bartha C (2000) Home based exercise therapy for older persons with knee osteoarthritis: a randomized clinical trial. **J Rheumatol** (27) 2215-2221.

Hurley MV, Scott DL (1998) Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. **Br J Rheumatol** (37) 1181-1187.

Lewek MD, Rudolph KS, Snyder-Mackler L (2004) Quadriceps femoris muscle weakness and activation failure in patients with symptomatic knee osteoarthritis. **J Orthop Res** (22) 110-115.

Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, et al (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur J Appl Physiol** (88) 50-60.

Petterson SC, Mizner RL, Stevens JE, Raising L, Bodenstab A, Newcomb W, et al (2009) Improved function from progressive strengthening interventions after total knee arthroplasty: a randomized clinical trial with an imbedded prospective cohort. **Arthritis Rheum** (61)174-183.

Goldring MB (2000) The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, p. 16-26.

Aroskoki JPA, Hyttinen MM, Lapveteläinen T, Takács P, Kosztaczky 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.

Saamamén AM, Kiviranta I, Jurvelin J, Helminen HJ, Tammi M (1994) Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. **Connect Tissue Res** (30) 191-201.

Ameyé LG, Young MF (2006) Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the 'Holy Grail'. **Current Opinion in Rheumatology** (18) 537-547.

Bendele AM (2001) Animal models of osteoarthritis. **J Musculoskel Neuron Interact** (4) 363-376.

Bennell K, Hinman R (2005) Exercise as a treatment for osteoarthritis **Current Opinion in Rheumatology** (17) 634-640.

Kaab MJ, Ito K, Clark JM, Notzli HP (2000) The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, p. 464-473.

ANEXO – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal
nº 021/2010

Protocolo nº. 021/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar em sua 42ª. Reunião **APROVOU** o projeto "Efeito do exercício resistido na cartilagem articular de ratos submetidos a transecção do ligamento cruzado anterior" apresentado pelo pesquisador Fernando Augusto Vasilceac.

São Carlos, 18 de maio de 2010.


Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal