

JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO

**CARACTERIZAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DO
JOELHO DE RATOS SUBMETIDOS A ESFORÇOS DE
REPETIÇÃO EM ESTEIRA ROLANTE**

CAMPINAS

2006

JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO

**CARACTERIZAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DO
JOELHO DE RATOS SUBMETIDOS A ESFORÇOS DE
REPETIÇÃO EM ESTEIRA ROLANTE**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área de concentração em
Cirurgia Experimental*

Orientador: Prof. Dr. William Dias Belangero

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C14c Camargo Filho, José Carlos Silva
Caracterização da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos a esforços de repetição em esteira rolante / José Carlos Silva Camargo Filho. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : William Dias Belangero
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Morfologia. 2. Esteira rolante. 3. Termogravimetria - método. I. Belangero, William Dias. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Characterization of the knee articular cartilage of rats submitted to repetition efforts on treadmill running

Keywords: • Morphology

- Treadmill running
- Thermogravimetry - method

Área de concentração : Pesquisa Experimental

Titulação: Doutorado em Cirurgia

**Banca examinadora: Prof Dr William Dias Belangero
Prof Dr João Batista de Miranda
Prof Dr Sérgio Rocha Piedade
Prof Dr Mário Jefferson Quirino Louzada
Prof Dr Alberto Cliquet Junior**

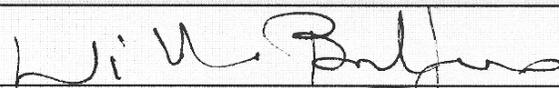
Data da defesa: 31-03-2006

Banca examinadora da tese de Doutorado

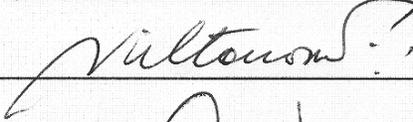
Orientador: Prof. Dr. William Dias Belangero

Membros:

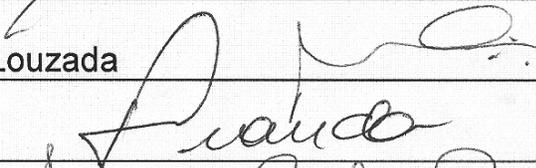
1. Prof. Dr. William Dias Belangero



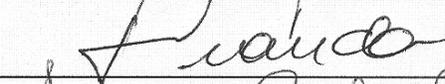
2. Prof. Dr. Nilton Mazzer



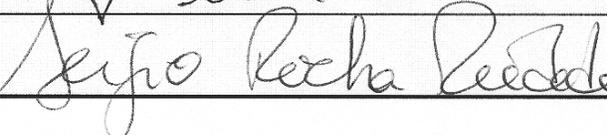
3. Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada



4. Prof. Dr. João Batista de Miranda



5. Prof. Dr. Sérgio Rocha Piedade



Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/03/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Thiago, Guilherme e Gabriel, que me dão paz, que me alimentam diariamente com ternura

Aos meus pais, Aileen e José Carlos, Que me transmitiram a humildade, que me encaminharam na verdade.

*A Regina Celi minha esposa,
Que me ensina a viver
Que me ensina a respeitar
Que me ensina a amar*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr William Dias Belangero meu orientador : “Aquilo que guardamos para nós acabamos perdendo um dia, o que compartilhamos, conservamos para sempre” (J.Paul Schimitt). À sua compreensão, pelas dificuldades que passei, à sua dedicação, em todo o transcurso do doutorado, principalmente nesta fase final, que, com prejuízo de sua saúde, não mediu esforços, mostrando que o seu compartilhar não fica restrito ao campo do conhecimento, mas da amizade fraterna que nos une como irmãos. Muito obrigado.

A Pedagoga Sonia D. Rodrigues, pela amizade, pelo seu carinho, pela transmissão de conhecimentos e, principalmente, pela dedicação ímpar prestada nos momentos cruciais da elaboração da tese.

A Bióloga Nilza Alzira Batista responsável técnica do Laboratório de Biomecânica (LABIMO), pela amizade e auxílio no preparo do material de análise.

A jovem bióloga Ana Amélia Rodrigues, pelo carinho e apoio irrestrito na obtenção das imagens do microscópio e também pelo conhecimento dispensado quando das análises histológicas.

Aos Profs. Drs. Nilton Mazzer, Alberto Cliquet Jr., Mário Jefferson Quirino Louzada, Sonia M. Malmonge, Sergio Rocha Piedade e João Batista de Miranda, pelo aceite imediato de participação na Banca de Defesa desta tese.

Ao Professor Doutor Vitalino Dal Pai, pela amizade, incentivo e disposição para orientação das técnicas desenvolvidas para a coloração das lâminas, e também para as análises.

Ao amigo Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei, pelo apoio em todo momentos fundamentais de minha carreira universitária.

Ao amigo Prof. Dr. Aldo Eloizo Job, que primeiramente lançou a idéia de se utilizar o equipamento de Análises Termogravimétricas para obtenção dos dados e, depois, pela dedicação e amizade durante as análises.

Aos funcionários do Departamento de Ortopedia da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp: Eliana Sena Gianpauli, Daniela Rufino e Luiz Roberto Monteiro, pela atenção e colaboração em todos os momentos.

A secretária da Pós Graduação, Vera Maria Barbosa, pela atenção e dedicação.

Aos meus familiares, que me incentivaram e me auxiliaram em todos os momentos. Silvia Helena, Ana Beatriz, Cícero, Clarisse, Gustavo, Larissa e Luana.

Aos demais Professores do Curso de Pós Graduação em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, em especial, ao Professor Doutor Nelson A. Andreollo, pela orientação e dedicação na resolução das intercorrências durante o tempo do curso.

À Direção da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, à Chefia e Coordenação de Curso e aos colegas do Departamento de Fisioterapia, que me incentivaram e apoiaram.

À Profa. Dra. Vera M S Belangero, pela atenção, carinho e paciência em vários momentos.

À CAPES que forneceram suporte financeiro para a realização do curso.

Ao funcionário do laboratório de histologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia- UNESP, meu amigo Sidney, obrigado pela atenção e dedicação.

*As idéias que defendo não são minhas,
Eu as tomei emprestada de Sócrates,
Roubei-as de Chesterfield,,
furtei-as de Jesus.
E se você não gostar das idéias deles.
Quais seriam as idéias que você usaria?*

Dale Carnegie

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO	19
1.1– Cartilagem articular	21
1.2– Colágeno	21
1.3– Proteoglicanos	24
1.4– Arranjo estrutural e funcional da cartilagem hialina	25
1.5- Termogravimetria	31
1.5.1- Termogravimetria por infravermelho com transformada de Fourier (TG/FT-IR) acoplados.....	32
1.6– Resposta da cartilagem ao estresse	36
2 – OBJETIVOS	43
2.1– Objetivo Geral	44
2.2–Objetivos Específicos	44
3- MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1– Animal de experimentação	46
3.2– Equipamento	47
3.3– Procedimento experimental	48
3.4– Protocolo de treinamento	48

3.5– Preparo do material histológico.....	50
3.6– Análise histológica.....	51
3.7– Análise morfológica.....	51
3.7.1– Contagem de condrócitos.....	51
3.7.2– Medida da espessura da cartilagem.....	52
3.7.3– Análise do contorno e da espessura da cartilagem pelo estereomicroscópio.....	52
3.8– Análise termogravimétrica.....	52
4- RESULTADOS.....	54
4.1– Análise do peso corporal.....	55
4.1.1– Peso inicial.....	55
4.1.2– Peso final.....	56
4.2– Análise histológica da cartilagem articular.....	57
4.2.1– coloração por HE.....	57
4.3– Morfometria.....	61
4.3.1 – Espessura da cartilagem.....	61
4.3.2 – Contagem dos condrócitos.....	64
4.4– Termogravimetria.....	67
4.4.1 – Avaliação pelo estereomicroscópio.....	71
5 - DISCUSSÃO.....	76
6 – CONCLUSÕES	88
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

nm	Nanômetros
kD	Kilodowtons
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
FT-IR	absorção no infravermelho com transformada de Fourier
TGV	Termogravimetria
°C	Graus Celsius
(TG/FT-IR)	Termogravimetria por infravermelho com transformada de Fourier
Mpa	Mega Pascal
(FCT)	Faculdade de Ciências e Tecnologia
(COBEA),	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
TGA	Análise termogravimétrica

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Apresentação dos valores individuais de peso corporal (em gramas) dos animais do grupo experimental e controle no início do estudo.....	56
Tabela 2- Apresentação dos valores individuais de peso corporal (em gramas) dos animais do grupo experimental no final do estudo.....	57
Tabela 3- Apresentação dos dados qualitativos obtidos na análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle.....	58
Tabela 4- Apresentação da mensuração da espessura da cartilagem articular dos animais do grupo experimental e controle e as respectivas médias aritméticas para cada animal.....	62
Tabela 5- Apresentação das médias da espessura dos grupos controle e experimental.....	63
Tabela 6- Apresentação das medidas do número de condrócitos do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por, 15, 30 e 60 dias e de suas respectivas médias aritméticas.....	65
Tabela 7- Apresentação da média, mediana e desvio padrão do número médio de condrócitos do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício em esteira por 15, 30 e 60 dias.....	66
Tabela 8- Apresentação dos valores individuais, das médias aritméticas e dos desvios padrão da porcentagem de perda de água obtidos pela termogravimetria no grupo controle e nos grupos com 15, 30 e 60 dias de esteira	70

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Termogravimetria do látex e da borracha natural, estabilizados e não estabilizados, em atmosfera de nitrogênio.....	32
Figura 2- Imagem 3 dimensões do látex estabilizado.....	33
Figura 3- Imagem em 3 dimensões da borracha natural preparado a partir do látex estabilizado.....	33
Figura 4- Espectros extraídos da imagem em 3 dimensões à temperatura 120°C e 370°C.....	34
Figura 5- Espectros extraídos da imagem em 3 dimensões à temperatura de 370°C.....	35
Figura 6- Gaiola coletiva utilizada para alojar os animais.....	46
Figura 7- Esteira rolante utilizada durante a realização dos experimentos.....	47
Figura 8- Esteira rolante utilizada para a realização dos experimentos com os animais.....	49
Figura 9- Esquema do joelho direito, onde está sendo mostrado o corte realizado para separação dos côndilos e esquema do joelho esquerdo onde está sendo mostrado o corte para separação dos côndilos e o segundo corte para retirada da face lateral do côndilo. O seguimento marcado com asterisco foi o observado pelo por meio do estereomicroscopia	50
Figura 10- Equipamento de Análise termogravimétrica (TGA) acoplado ao equipamento de espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier, marca Bruker modelo Vector 22.....	53

Figura 11-	Apresentação da análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle, em função da organização celular.....	59
Figura 12-	Apresentação da análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle, em função do número de “cluster”....	60
Figura 13-	Apresentação da análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle, em função da mitose celular.....	61
Figura 14-	Apresentação em box-plot da espessura média em milímetros da cartilagem do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por 15, 30 e 60 dias.....	64
Figura 15-	Apresentação em box-plot da contagem de condrócitos da cartilagem do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por 15, 30 e 60 dias.....	67
Figura 16-	Apresentação da curva TG e da imagem tridimensional correspondente resultante da análise de TGA-FTIR do fragmento de cartilagem do rato1 do grupo GE1 (15 dias de esteira).....	69
Figura 17-	Apresentação do espectro do infravermelho do gás evaporado do TG, à temperatura de 160 °C, de todo o grupo 1 (15 dias de esteira).....	70
Figura 18-	Apresentação em “box-plot” da porcentagem de perda de água da cartilagem do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por, 15, 30 e 60 dias.....	71
Figura 19-	Imagem da superfície articular de um fragmento do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 6 do grupo controle corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno da superfície regular da cartilagem articular e as medidas da espessura em diversos locais de carga.....	72

- Figura 20-** Imagem da superfície articular de um fragmento do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 7 do grupo controle corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno da superfície regular da cartilagem articular e as medidas da espessura em diversos locais de carga..... 72
- Figura 21-** Imagem da superfície articular de uma fatia do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 2 do grupo experimental (15 dias) corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno regular da superfície da cartilagem articular e as medidas da espessura semelhante ao controle em diversos locais de carga..... 73
- Figura 22-** Imagem da superfície articular de uma fatia do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 1 do grupo experimental (30 dias) corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno irregular da superfície da cartilagem articular e redução da espessura da cartilagem em diversos locais de carga..... 74
- Figura 23-** Imagem da superfície articular de uma fatia do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 4 do grupo experimental (60 dias) corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno irregular da superfície da cartilagem articular e redução da espessura da cartilagem em diversos locais de carga..... 75



RESUMO

O objetivo desse estudo, foi investigar qual o efeito produzido pela corrida em esteira rolante não inclinada, durante uma hora diária (cinco dias por semana), por 15, 30 e 60 dias, sobre a cartilagem hialina do joelho de ratos.

Foram utilizados 30 animais, divididos em seis grupos, sendo três experimentais (GE), com cinco animais em cada grupo, submetidos à esteira correndo 585 metros, durante 60 minutos por sessão, por cinco dias por semana, e três grupos controle (GC), com cinco animais em cada grupo, não submetidos ao treinamento físico. Os animais do grupo experimental foram sacrificados após 15 (GE-1), 30 (GE-2), e 60 (GE-3) dias de seguimento. Dos 15 animais do grupo controle foram selecionados aleatoriamente sete animais, sendo dois do grupo de 15 dias e de 30 dias e três do grupo de 60 dias para as análises histológicas por microscopia óptica convencional (côndilo lateral do fêmur direito), pela lupa estereotóxica (côndilo lateral do fêmur esquerdo) e pela termogravimetria (côndilo medial do fêmur direito), segundo critérios da International Cartilage Repair Society (2002), modificado. Essas avaliações foram feitas comparando-se o grupo experimental com o grupo controle quanto à desorganização celular, presença rara ou freqüente de “cluster”, mitoses, mensuração da espessura da cartilagem hialina, contagem do número de condrócitos, quantificação do conteúdo de água e aspecto da superfície articular analisadas com 16x e 32x de aumento. Todos os dados obtidos nos grupos controle e experimental foram comparados entre si utilizando-se testes não paramétricos (Prova U de Mann Whitney e teste de Kruskal Wallis) considerando-se significativo os valores de p iguais ou menores do que 0,05.

Do ponto de vista histológico houve maior desarranjo celular ($p=0,01$), maior número de mitoses ($p=0,02$), maior número de condrócitos ($p=0,003$) e diminuição da espessura da cartilagem hialina ($p=0,01$) entre o controle e os animais do grupo de 60 dias. Houve tendência ao aumento do conteúdo da água no grupo de 60 dias ($p=0,09$) assim como redução da espessura da cartilagem e alterações da forma da superfície articular em relação aos demais grupos em todos os côndilos observados com 60 dias.

Conclui-se que a atividade na esteira rolante utilizada durante 60 dias cinco dias por semana, uma hora por dia com percurso de 585 metros produziu alterações degenerativas na cartilagem hialina do côndio lateral do joelho de rato.



ABSTRACT

The effects of treadmill running on the knee hyaline cartilage was studied in rats. Thirty rats were divided in to six groups (five animals in each one). Three groups were used as control and three of them ran on the treadmill one hour a day, five days/week, for 15, 30 and 60 days. After this the animals were sacrificed. The hyaline cartilage was studied by optical microscopy (staining HE), by estereotaxic magnifying glass (magnified in 16 and 32X) and by Fourier transform infrared imaging spectroscopy. These analyses were done comparing the control group with the running group, and among the running groups with different times of exercises. In the histological analysis the grade of cellular organization in the layers of the cartilage, the frequency of the clusters and the mitoses and the number of chondrocytes was considered. The measurement of the thickness of the cartilage was done. The quantity of the water in the cartilage was evaluated by the reduction of the mass by evaporation in to 150°C, following the modified International Cartilage Repair Society score (2002). All results were analyzed by non-parametric tests, using Mann Whitney and Kruskal Wallis tests, with $p \leq 0,05$.

It was observed in histological analyses that the groups with 60 days of exercise presented cellular layers more disorganized ($p=0,01$), a higher number of mitoses ($p=0,02$) and chondrocytes ($p=0,003$), with hyaline cartilage thinner than the other groups ($p=0,01$).

Besides this, there was a tendency of the 60-day group to have an increase of water content ($p=0,09$). The examination by magnifying glass showed that the hyaline cartilage was reduced and presented abnormalities on their surfaces.

It was concluded that the exercise done by the rats on the treadmill over 60 days produced degenerative signs in the knee hyaline cartilage.



1- INTRODUÇÃO

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado que viabiliza o movimento entre os segmentos ósseos, praticamente sem fricção nas articulações sujeitas à carga por períodos prolongados. Essa função é dependente dos condrócitos, da matriz extracelular produzida por essas células e de um sistema hidráulico, representado pelo fluido articular, que se move para dentro e para fora da matriz, mantendo-a lubrificada e exercendo pressão hidrostática adequada para suportar as solicitações mecânicas.

A cartilagem é um tecido pobre em vasos, nervos e linfáticos, e quando lesada por trauma ou por processo degenerativo, evolui com pouca capacidade de regeneração intrínseca. Desta forma, o estudo dos processos envolvidos na reparação ou regeneração da cartilagem são importantes, inclusive para fundamentar possíveis intervenções que poderiam postergar ou minimizar a história natural da degeneração da cartilagem articular.

Do ponto de vista sócio-econômico, JACKSON et al. (2001) chamaram a atenção para o aumento progressivo do número de pacientes com lesões degenerativas da cartilagem articular que ocorrerá nos Estados Unidos (EUA), em parte pelo envelhecimento normal da população, em parte pelo aumento progressivo das atividades esportivas. Segundo esses autores, o custo do diagnóstico, da terapia e dos efeitos colaterais da terapia para a osteoartrite são um dos mais caros e debilitantes nos EUA. Além disso, levantamentos recentes mostram que a osteoartrite é responsável por mais de meio milhão de hospitalizações por ano naquele país. Como muitos desses pacientes estão em idade de trabalho, isso representa um alto custo para a sociedade, não só com o tratamento doença, mas também com a perda da produtividade desses indivíduos.

Embora se conheça relativamente bem a anatomia, fisiologia e os aspectos biomecânicos envolvidos nas funções articulares e, conseqüentemente, na cartilagem articular, assim como os fatores de risco para o desenvolvimento da osteoartrite, não existe até momento, consenso quanto à eficácia dos diversos tratamentos clínicos utilizados para alterar o curso natural da degeneração articular, motivo pelo qual é importante o conhecimento não só da anatomia como também da fisiologia envolvidas na cartilagem articular como um tecido altamente diferenciado.

1.1 – Cartilagem articular

A cartilagem articular se apresenta como um tecido consistente, ligeiramente depressível e elástica, de superfície lisa, brilhante, com reflexo branco azulado no jovem e branco-amarelado nas pessoas com idade avançada. Na periferia da articulação, a cartilagem se prolonga por uma zona de transição, onde se encontra com a cápsula, com a membrana sinovial e com o perióstio da epífise. A extensão do recobrimento da epífise pela cartilagem articular (ou hialina) depende diretamente do arco de movimento da epífise.

Em geral, a espessura da cartilagem é bastante variável e depende se está em articulações que suportam maior ou menor carga. No ser humano ela varia de 0,5 mm, na cavidade glenóidea das falanges, a 4,0 mm, no centro dos planaltos da tíbia. Normalmente, a espessura da cartilagem é maior no sexo masculino e em pessoas obesas essa espessura não diminui com a idade (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015).

Apesar de não conter vasos linfáticos ou nenhuma terminação nervosa, a cartilagem pode ser considerada, na sua intimidade, como uma estrutura altamente complexa, que suporta grandes exigências do ponto de vista funcional.

A cartilagem articular pode ser analisada em função dos seus aspectos morfológicos, bioquímicos e biofísicos, sendo considerada uma estrutura complexa, tanto do ponto de vista estrutural como biomecânico, apresentando propriedades anisotrópicas, ou seja, características biomecânicas diferentes ao longo da sua estrutura. Esse tecido é representado por duas fases: uma sólida, que corresponde à matriz composta de colágeno e proteoglicanos, e outra fluída, representada pela água dispersa e agregada na matriz e pelo líquido sinovial. As propriedades mecânicas da cartilagem são dependentes da interação dessas duas fases (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015).

1.2 - Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante encontrada no corpo humano e está relacionada principalmente com sua arquitetura e função. Assim, pode-se encontrar diferentes tipos de colágeno, segundo o papel que essas proteínas desempenham em cada um dos órgãos do qual fazem parte (CHAMPE e HARVEY, 1996). Essas proteínas do tipo fibroso insolúveis são encontradas na matriz extracelular e no tecido conjuntivo (MURRAY et al., 1994).

Quanto à classificação, existem pelo menos 18 tipos de colágeno, sendo que os tipos I, II e III são os mais abundantes no organismo. O tipo I está presente na pele, tendão e osso; o tipo II na cartilagem e humor vítreo e, o tipo III, na pele e músculos (MURRAY et al., 1994).

Cada molécula de colágeno tem a forma de um bastão pequeno e rígido, formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas, chamadas alfa que, por sua vez, são codificadas por genes diferentes. As três cadeias peptídicas são mantidas juntas por pontes de hidrogênio entre as cadeias. Essa estrutura protéica justifica as propriedades físicas e biológicas dos colágenos: como por exemplo, a rigidez e estabilidade (MURRAY et al., 1994).

A estrutura primária do colágeno é incomum, uma vez que a glicina, o menor aminoácido, é encontrada a cada três posições na cadeia polipeptídica. Os resíduos de glicina são parte de uma seqüência repetitiva, -Gli-X-Y-, onde X, freqüentemente, é a prolina e Y, a hidroxiprolina ou hidroxilisina (CHAMPE e HARVEY, 1996).

Os precursores polipeptídicos da molécula de colágeno são formados nos fibroblastos (ou nos osteoblastos correspondentes do osso e condroblastos da cartilagem) e são secretados na matriz extracelular. Após modificação enzimática, os monômeros de colágeno maduros agregam-se e formam ligações cruzadas para formar as fibrilas de colágeno (CHAMPE e HARVEY, 1996).

Em alguns tecidos, o colágeno pode estar disperso como um gel, que serve para enrijecer a estrutura, como na matriz extracelular da cartilagem. Em outros, o colágeno pode estar reunido em fibras paralelas, que fornecem resistência predominantemente à tração, como nos tendões.

Em nível celular, os colágenos são sintetizados como pró-colágenos. Após a secreção dessas moléculas, seus fragmentos terminais são clivados por meio de enzimas extracelulares, chamadas collagenases, e liberados na circulação sanguínea. Com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno, que se polimerizam para formar fibrilas colágenas que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas (MURRAY et al., 1994).

A cartilagem articular contém vários tipos de colágeno: II, XI, IX, VI e, provavelmente, V e I. O colágeno tipo II é o principal componente, encontrando-se também no núcleo pulposo, nos discos intervertebrais, na região vítrea do olho e em vários órgãos embrionários. Esse colágeno é formado por uma tripla hélice de aproximadamente 300 nm, com uma periodicidade de 67 nm (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015). As moléculas do colágeno tipo II são formadas por três cadeias idênticas, denominadas de alfa I, sintetizadas na forma de um precursor, que é o pró-colágeno tipo II.

O condrócito representa de 3 a 10% do volume da porção sólida da cartilagem articular, distribuído nas suas diversas camadas. Inicialmente, a cartilagem foi considerada uma estrutura inerte, mas atualmente sabe-se que os condrócitos são responsáveis pela sua manutenção. Possuem atividade mitótica, demonstrada pela síntese de DNA nas faixas etárias mais precoces, embora perca esta capacidade na idade adulta. No entanto, em situações adversas de estresse elevado, os condrócitos são capazes de reiniciar a síntese de DNA e, portanto, a divisão celular (STOCKWELL, 1979; QI e SCULLY, 2001).

Essas células estão envolvidas por uma cápsula, composta por uma fina camada de proteínas do tipo hialuronato e por fibras de colágeno, que tem a função de proteger as células dos diferentes estímulos físicos e químicos. O condrócito tem como principal atividade a síntese da matriz extracelular, formada principalmente pelos proteoglicanos e colágeno, utilizando tanto o metabolismo aeróbico como anaeróbico. Os fatores que determinam essa atividade metabólica, resultando na produção da matriz, não estão totalmente esclarecidos, mas provavelmente, são influenciados pelas necessidades biomecânicas locais (MOW et al, 1989), por mediadores químicos e por fatores de crescimento celular.

A matriz extracelular tem característica de um gel e é composta por 70% a 80% de água, que é essencial para a função e lubrificação das articulações, e 30% da sua parte sólida é formada principalmente por colágeno e proteoglicanos.

1.3 - Proteoglicanos

Os proteoglicanos representam um grupo variado e complexo de moléculas formado por uma proteína, onde se fixam uma ou várias cadeias de glicosaminoglicanos (MOW et al. 1989). Os monômeros proteoglicanos, ou subunidades, consistem de um proteína central com 200 nM de comprimento, com aproximadamente 150 cadeias de glicosaminoglicanos associadas. A cartilagem pode conter diversas classes de proteoglicanos: os proteoglicanos de cadeia longa (ou agreicanos), com peso molecular de $1,5 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ D, cujas moléculas formam grandes agregados entrelaçados entre si não covalentes e ligados ao ácido hialurônico; os proteoglicanos de cadeia longa, menos caracterizados e não associados ao ácido ialurônico; os proteoglicanos pequenos, com proteínas como a decorina, biglican e a fibromodulina; os proteoglicanos associados à membrana dos condrócitos e fragmentos de proteoglicanos, que se acumulam com o passar dos anos e que permanecem unidos ao ácido hialurônico.

Os proteoglicanos de cadeia longa são formados principalmente de carboidratos do tipo condroitin sulfato (que contém 25 a 30 unidades de dissacarídes) e queratan sulfato (que contém 13 unidades de dissacarídes), unidos por ligações covalentes a uma proteína central com 220 a 250 kD. Três proteoglicanos de baixo peso molecular (biglican decorina e fibromodula) são encontrados em diferentes tipos de tecido conjuntivo, incluindo a cartilagem. Esses proteoglicanos têm proteínas com peso molecular de aproximadamente 40 kD. Atualmente, é aceito que a agregação dos proteoglicanos na rede do colágeno adiciona rigidez estrutural à matriz extracelular (MOW et al., 1989; MUIR 1983).

Com a maturação da cartilagem articular ocorre alterações na composição e na estrutura dos proteoglicanos. Está bem documentado que com o envelhecimento da cartilagem articular a relação entre o conteúdo de água e de carboidratos-proteína reduz progressivamente (ROUGHLEY e WHITE, 1980; GARG e SWANN, 1981). Essa redução está principalmente apoiada na redução do conteúdo do condroitin sulfato e, por outro lado, ocorre aumento progressivo do queratan sulfato com o aumento da idade. Assim, a relação condroitin sulfato – queratan sulfato, que no nascimento é de 10/1, na idade adulta chega a ser de 2/1 (SIMUNEK e MUIR, 1972; SWEET et al, 1979).

Pode se considerar a água como o componente mais abundante da cartilagem articular, sendo que na sua superfície a concentração desta é de aproximadamente 80%. À medida que vamos para regiões mais profundas, essa concentração de água se reduz e na zona profunda da cartilagem passa a ser de 65% (LIPSHITZ et al., 1976). Esse fluido contém muitos cátions livres, como sódio e cálcio, que têm, como já mencionado anteriormente, influência importante no desempenho mecânico da cartilagem. Além disso, a água tem papel essencial na sobrevivência desse tecido avascular, pois permite a difusão de gases, nutrientes e produtos de degradação entre os condrócitos e o fluido da membrana sinovial (MANKIN e THRASHER, 1975).

Somente uma pequena porcentagem da água da cartilagem é intracelular (30%), fortemente associada com as fibras de colágeno (TORZILLI et al., 1976). A maioria da água ocupa o espaço intermolecular e é livre para se mover, quando gradientes de carga e pressão são aplicados sobre esse tecido, de tal modo que quando submetido à carga, 60% desse fluido pode se mover, representando assim um importante controle no comportamento mecânico da cartilagem articular e da sua lubrificação (MOW et al., 1984; ARMSTRONG e MOW et al., 1982).

1.4 – Arranjo estrutural e funcional da cartilagem hialina

Em relação à capacidade de regeneração, desde os primeiros trabalhos realizados por John Hunter no século XIX, que estudou a morfologia da cartilagem articular, a principal dúvida é se esse tecido tem ou não capacidade de se reparar. Devido às suas características anatômicas, a idéia que prevaleceu até o início do século XX é de que a cartilagem não tinha essa capacidade. A identificação da presença de polissacarídes na matriz cartilaginosa e a utilização de marcadores com radioisótopo, a partir do final da década de 50, mostraram que os condrócitos tinham capacidade de absorver substâncias sulfatadas, que participam ativamente da síntese dos proteoglicanos.

Mudanças importantes no entendimento da fisiologia desse tecido ocorreram no início da década de 60, quando se iniciaram as investigações sobre o processo de degradação da matriz cartilaginosa, e trabalhos de grupos importantes surgiram, buscando dar maiores esclarecimentos a esse fato (BALAZS et al., 1966; BOLLET e NANCE, 1966). Essas novas informações concluíram que a cartilagem não era um tecido inerte, mas sim um tecido que se renovava rapidamente por meio de um controle químico e que a sua degradação era muito mais devido a um processo químico do que mecânico, sendo, inclusive, possível que a identificação desse processo químico pudesse reverter as reações que levariam à degeneração articular.

Atualmente, sabe-se que, do ponto de vista fisiopatológico, eventos físicos, mais especificamente traumáticos, e alterações bioquímicas estão ligadas entre si e seus efeitos vêm se tornando cada vez mais claros, de tal modo que medidas farmacológicas podem, inclusive, controlar ou até reverter o processo osteoartrítico.

Os mecanismos imunes ou autoimunes são, na atualidade, os maiores desafios para o entendimento desse processo. Citocinas, prostaglandinas, leucotrienes, produtos oriundos do catabolismo da matriz e fatores de crescimento são hoje substâncias que necessitam de maior compreensão para se estudar o processo artrítico.

Utilizando técnicas com radioisótopos, Mankin (1963)¹ mostrou que a cartilagem articular imatura tem duas zonas de proliferação: uma profunda, relacionada com o núcleo de ossificação da epífise, que provê células para a ossificação endocondral desse núcleo, e uma zona superficial, logo abaixo da superfície articular. Quando uma espessura é atingida durante o primeiro ano de vida, essa zona superficial cessa sua proliferação e somente a zona profunda continua produzindo células cartilaginosas.

Quando a cartilagem articular atinge a sua maturidade, observa-se a região do “tidemark”, que é uma linha escura separando a zona calcificada da não calcificada da cartilagem hialina. O aparecimento dessa linha coincide com a maturidade esquelética e a parada do processo de ossificação endocondral.

¹ MANKIN, H.J. Effect of systemic corticosteroids on rabbit articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 15: 593, 1972. In: ALBRIGHT, J.A.; BRAND, R.A. *The Scientific basis of Orthopaedics*. Appleton e Lange, 1987, 2ª. Edição, Connecticut (EUA).

Logo abaixo da cartilagem calcificada desenvolve-se uma região denominada de osso subcondral, que recebe grande quantidade de vasos sanguíneos. Em geral, detecta-se pouca atividade mitótica numa cartilagem articular madura e há, portanto, pouca compensação quando ocorre perda celular por lesões ou atrito dessa cartilagem durante a vida animal.

Em condições de estresse, na cartilagem articular madura ocorre uma reversão do condrócito em condroblasto imaturo, na tentativa de se estabelecer um processo reparativo. Esses condrócitos iniciam a produção de DNA e divisão celular; a linha “tidemark” desaparece, vasos penetram na cartilagem e os condrócitos aumentam a produção de mucopolissacarídes, do mesmo modo que ocorre na cartilagem imatura. Infelizmente a quantidade e a qualidade da matriz produzida é limitada e, normalmente, inadequada para prevenir a lesão cartilaginosa (BALAZS et al., 1966).

A arquitetura da cartilagem articular tem papel importante no seu funcionamento. O arranjo clássico em zonas compreende uma zona de deslizamento, uma zona de transição, outra radial e a zona calcificada. A distribuição, assim com a heterogeneidade dos condrócitos dessas camadas, deve ser enfatizada (MOW et al., 1989).

A zona de deslizamento consiste de duas camadas: uma denominada de superficial e outra de tangencial. A mais superficial consiste apenas de colágeno, não se encontrando praticamente mucopolissacarídes nesse local (MAROUDAS et al., 1973). O colágeno é organizado de forma aleatória em feixes achatados, que correm paralelos à superfície articular (WEISS et al., 1968). As células nessa camada tangencial são pequenas, lembrando fibroblastos no seu longo eixo, paralelos à superfície articular. Devido a esse arranjo do colágeno, a cartilagem nessa região suporta, em geral, muito mais forças de tensão aplicadas paralelas ao seu eixo de movimento do que num plano perpendicular (WOO et al., 1976).

Quando a cartilagem sofre estresse contínuo, principalmente com movimentos rotatórios associados, mais freqüentes nas instabilidades articulares do joelho ou do tornozelo, pode ocorrer ruptura desses feixes de colágeno, iniciando-se, desse modo, um processo de degeneração articular.

A presença de derrame e diminuição dos proteoglicanos, assim como uma lubrificação insuficiente, podem também predispor essa lesão mecânica da cartilagem articular que, em geral, apresenta uma superfície lisa. Quando essa camada superficial é lesada, as camadas mais profundas tornam-se vulneráveis à ação de enzimas sinoviais e de produtos de degradação da própria matriz. Entre a zona de deslizamento e a zona calcificada, lacunas esféricas com condrócitos estão separadas por uma matriz composta primariamente de proteoglicanos, colágeno e água. A razão célula-matriz diminui e a concentração de proteoglicanos aumenta, à medida que vamos para as camadas mais profundas da cartilagem articular (MAROUDAS et al., 1973).

Abaixo da zona de deslizamento há a zona denominada de transição, com alguns feixes de colágeno atravessando-a obliquamente e mantendo-se ainda paralelos ao plano do movimento articular (WOO et al, 1976).

Na camada mais profunda, denominada de zona radial, os feixes de colágeno apresentam orientação mais aleatória, mas mesmo assim alguns tendem a ser mais verticalizados, buscando, então, a união das camadas mais superficiais com a camada da cartilagem calcificada. Esses feixes não são contínuos e, portanto, não exercem efeito de mola quando a cartilagem é submetida à compressão, o que, de certo modo, explica porque se podem observar fraturas nessa região, ou regiões de clivagem verticais. A chamada “tidemark” é uma linha que define o limite entre cartilagem calcificada e não calcificada no adulto, com 2 a 5 μm de espessura, formada por uma linha densa de colágeno que corre paralela à superfície articular e, por vezes, intersectadas por fibras de colágeno em ângulo reto da zona radial. O padrão ondulado da “tidemark” pode resistir à força de cisalhamento e pode-se também observar atividade celular específica nessa região, afetando a calcificação fisiológica da cartilagem

A zona da cartilagem calcificada está encontrada entre o “tidemark” e o osso subcondral e representa a parte calcificada da epífise de crescimento. Nessa região se encontram colunas de condrócitos separados por barras de cartilagem hialina, podendo se encontrar também invasão de vasos provenientes da porção óssea subjacente. Com o envelhecimento do animal, as células perdem essa organização em colunas e as barras de cartilagem calcificam-se progressivamente. O osso subcondral suporta a porção calcificada

da cartilagem e é composto de uma parte óssea densa, com o sistema de Ravers bem desenvolvido (BULLOUGH e JAGANNATH, 1983).

A cartilagem articular transmite e distribui os esforços mecânicos, de certo modo amortecidos por ela, de um segmento do membro ao outro. Esses esforços são gerados durante a marcha e durante a postura, produzidos por diversos tipos de alavancas, que podem produzir esforços de até seis ou sete vezes o próprio peso corporal. Além disso, a cartilagem propicia um deslizamento entre as epífises, mesmo quando submetida à carga, em condições tribológicas ótimas, necessitando para isso ter, além das suas características intrínsecas, boa lubrificação. Para tanto, é importante que o coeficiente de fricção da cartilagem hialina seja muito baixo, por volta de 0,02, índice menor do que de qualquer material feito pelo homem.

A carga suportada pela cartilagem depende principalmente das suas propriedades e de componentes bioquímicos. Os agregados moleculares e proteoglicanos e de ácido hialurônico estão envolvidos por cargas aniônicas, devido à presença de grupos SO_4^- e COO^- , encontradas nas cadeias do glicosaminoglicanos. A densidade de cargas fixas, que é o valor total das cargas, reflete a concentração de proteoglicanos nos tecidos e, como essas cargas se repelem mutuamente, mantém essas moléculas em estado de extensão, atraindo íons de carga oposta. No caso, predominantemente o íon sódio, que faz com que esse tecido seja extremamente hidrofílico. Isso faz com que a rede fibrosa formada pelo colágeno permaneça rígida e preenchida pelos proteoglicanos. A pressão interna da cartilagem sem carga é de aproximadamente duas atmosferas. E a movimentação da água nesse tecido, mesmo sob pressão, se faz de forma vagarosa.

De certo modo, essa arquitetura explica porque quando se aplica uma carga brusca sobre a cartilagem essa carga faz com que a pressão interna suba rapidamente e, à medida que a carga cessa, ocorre uma fase de adaptação e acomodação, provavelmente decorrente de uma nova organização dos líquidos e da água no seu interstício. Ao cessar a carga, a tendência é o retorno da situação de equilíbrio, porém agora de forma lenta. Assim, deformações moderadas são reversíveis e não provocam lesão da cartilagem, mas deformações que rompem a trama fibrosa podem acarretar hiperhidratação dos proteoglicanos, iniciando-se, assim, uma primeira etapa da degradação do tecido cartilaginoso.

A resistência da cartilagem à compressão está, portanto, condicionada à sua permeabilidade e à concentração de proteoglicanos que, em última análise, regulam o movimento dos fluídos de uma região pra outra. Quanto mais elevada a concentração de proteoglicanos, maior é a permeabilidade e mais resistente o tecido à compressão. Por outro lado, se ocorrer destruição dos proteoglicanos, mais deformável será a cartilagem articular, ou seja, quanto mais rígida a cartilagem, menor a sua chance de se desgastar.

Considera-se, assim, a cartilagem um material viscoelástico, pois quando submetido a uma carga constante, ou a uma deformação constante, a sua resposta varia com o tempo. Isso ocorre porque, na realidade, a sua resposta é a combinação de um material fluido viscoso com um material sólido elástico. Tipicamente, todo material viscoelástico sólido submetido a um carregamento constante tem como primeira resposta uma deformação rápida, seguida de uma lenta e progressiva (tempo-dependente), conhecida como deformação em arrasto (“creep”), até que a situação de equilíbrio seja alcançada. Por outro lado, quando esse mesmo material é submetido à ação de uma força deformante e constante, ele responde com alta resistência, que seguida de uma resistência que vai reduzindo progressivamente com o tempo, necessária para manter a deformação, conhecida como relaxamento de tensão.

Essas duas situações podem ser causadas por mecanismos diferentes. Nos materiais poliméricos sólidos, esse fenômeno ocorre pela fricção interna causada pelo momento entre as cadeias dos polímeros tensionados (FERRY, 1970). Em geral, é deste modo que os tendões e ligamentos respondem (WOO et al., 1981).

A viscoelasticidade também ocorre nos ossos e isso é devido ao deslizamento das lamelas nos interior dos osteons, banhado pelo fluído intersticial (LAKES e SAHA, 1979).

O comportamento viscoelástico da cartilagem submetida à compressão ocorre pelo fluxo do fluído intersticial (MOW et al., 1989; MOW et al. 1984) e o cisalhamento ocorre, principalmente, devido ao movimento das cadeias longas, dos proteoglicanos e colágeno (MOW et al. 1984). A viscoelasticidade produzida pelo fluxo do fluído intersticial é conhecida como comportamento viscoelástico bifásico, enquanto que a

viscoelasticidade resultante do movimento macromolecular é conhecida como fluxo independente, ou viscoelasticidade intrínseca, secundária à porção sólida da matriz (colágenos e proteoglicanos) (HAYES e BODINE, 1978; MOW et al. 1989).

Progressos importantes no estudo da cartilagem têm sido feito por meio da análise das enzimas, com métodos histoquímicos, radioautográficos, histoenzimológicos e imunohistoquímicos. Paralelamente, podemos também citar as análises da cartilagem realizadas por equipamentos que avaliem as características físico-químicas e mecânicas desse tecido. Nessa linha de investigação, pode-se incluir os equipamentos de termogravimetria (TGA) acoplado com ao espectrômetro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (BI et al., 2005).

1.5– Termogravimetria (TGV)

Esta é uma técnica dinâmica baseada no estudo da variação da massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. A perda de massa desse material é medida continuamente, enquanto a temperatura é aumentada a uma razão constante. Os gases evaporados nos estudos termogravimétricos são canalizados, por diferença de temperatura, para uma câmara que faz as medidas de infravermelho simultâneo, para identificar o tipo de substância e as ligações químicas presentes nessas substâncias volatizadas (SKOOG et al., 2002).

Para melhor entendimento desse processo, é apresentado abaixo (Figura 1) os resultados da análise termogravimétrica do látex e da borracha natural. A curva com menor estabilidade térmica refere-se à perda de massa do látex. A perda de massa de cerca de 60% para o látex ocorre na faixa de temperatura entre 27°C e 160°C, estão relacionados tanto com a evaporação de água, como a liberação de subprodutos dos componentes não borrachas presentes no látex (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos). Nota-se claramente que a proporção de borracha seca do látex é de 40%, sendo que a decomposição ocorre a partir de 320°C. As curvas com maior estabilidade térmica

representam o comportamento da perda de massa das borrachas secas, onde a decomposição inicia também a partir de 320°C. Após a perda da água o látex apresenta comportamento semelhante ao da borracha.

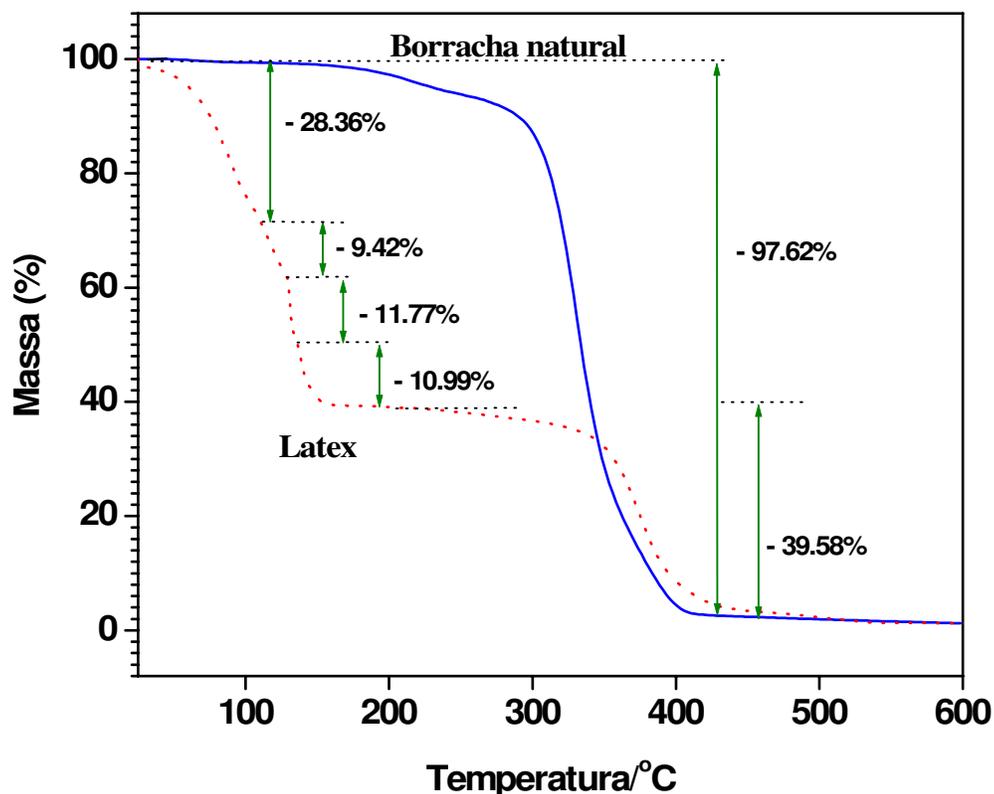


Figura 1 – Termogravimetria do látex e da borracha natural, estabilizados e não estabilizados, em atmosfera de nitrogênio.

1.5.1– Termogravimetria por infravermelho com transformada de Fourier (TG/FT-IR) acoplados

Simultaneamente, medidas de espectroscopia de infravermelho são feitas do gás emitido pela amostra canalizado para uma câmara que faz os espectros de FT-IR a cada segundo. Os resultados dessa análise são agrupados para formar imagem em três dimensões, onde se observa o número de ondas por centímetro, a temperatura e absorvância (SKOOG et al., 2002; BI et al., 2005).

Na figura 2 são apresentadas as medidas das amostras da solução do látex e da borracha natural respectivamente e do espectro de FT-IR, cujos picos de absorção ocorrem em duas faixas distintas de temperaturas. A primeira faixa está entre 27 e 160°C e relacionada tanto com a evaporação de água, como com a liberação de subprodutos presentes na borracha e no látex (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucléicos).

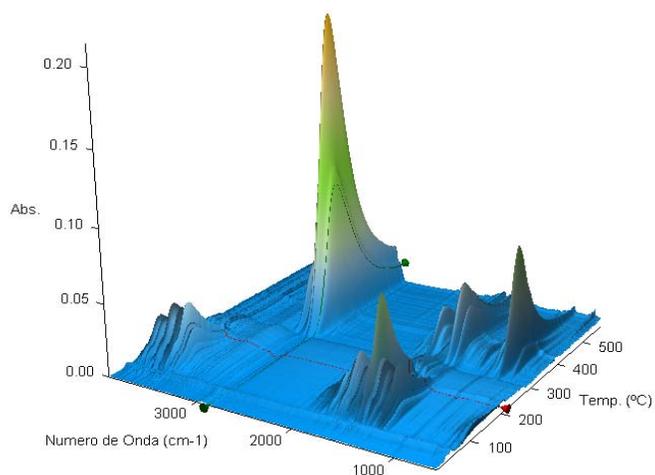


Figura 2 - Imagem 3 dimensões do látex estabilizado

A segunda faixa refere-se à decomposição da borracha seca que ocorre a partir de 320°C até 376°C (Figura 3).

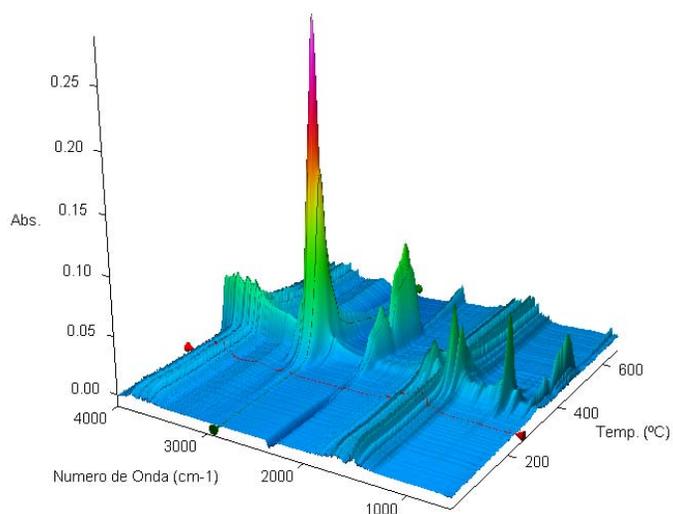


Figura 3 – Imagem em 3 dimensões da borracha natural preparado a partir do látex estabilizado.

Na Figura 4 são mostrados os dois espectros de FT-IR extraídos da imagem em 3 dimensões da Figura 2, exatamente na temperatura de 120°C e em 370°C, onde ocorre maior absorbância respectivamente. No espectro referente à temperatura de 120°C, observa-se que os picos de absorção são característicos de moléculas de água. Esta medida confirma a perda de materiais de subprodutos dos componentes do látex. A absorção em 1339 cm⁻¹ corresponde a estiramento simétrico N=N-O, em 1500 cm⁻¹ corresponde ao estiramento do anel benzeno em combinações aromáticos, em 1717 cm⁻¹ corresponde ao estiramento C=O e na faixa entre 3520-3320 cm⁻¹ correspondem a estiramento NH característica de amins primárias e amins aromáticas, todos com fraca absorção. No espectro referente à temperatura de 370°C, a absorção em 800 cm⁻¹ corresponde a deformação CH fora do plano, em 893 cm⁻¹ corresponde a vibração (wag) CH₂ fora do plano, entre 1380-1370 cm⁻¹ ocorre deformação simétrica CH₃ de combinações alifáticos, em 1450 cm⁻¹ ocorre deformação anti-simétrica CH₃, a absorção em 1642 cm⁻¹ corresponde a deformação NH₃ de aminoácidos, absorção entre em 1797 cm⁻¹ corresponde a estiramento C=O, absorção entre 2850-2990 cm⁻¹ corresponde a estiramento simétrico e anti-simétrico CH de combinações alifáticos (em 2930 cm⁻¹ corresponde a -CH₂ e 2973 cm⁻¹ corresponde a -CH₃), absorções entre 3200-3000 cm⁻¹ correspondem a estiramento anti-simétrico NH₃ de aminoácidos.

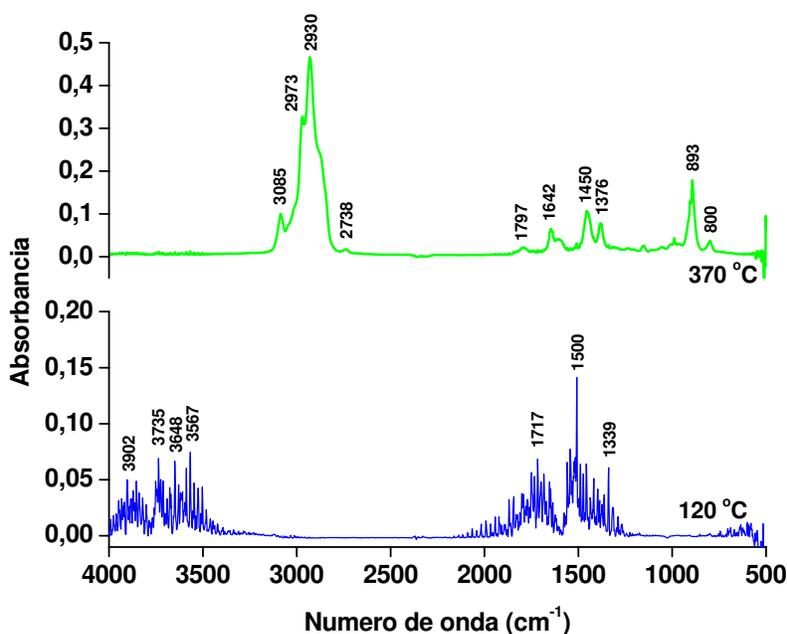


Figura 4 – Espectros extraídos da imagem em 3 dimensões à temperatura 120°C e 370°C

A Figura 5, amostra de borracha natural, apresenta o espectro de FT-IR, extraído da imagem em 3 dimensões da figura 3, referente à temperatura de 370°C, onde os picos de absorção ocorrem na faixa de temperatura entre 279 e 440°C correspondente à degradação estrutural da borracha. No espectro são observados que as absorções são semelhantes às ocorridas no espectro extraído da figura 3 como era de se esperar, pois ocorre o mesmo fenômeno que é a queima da borracha seca.

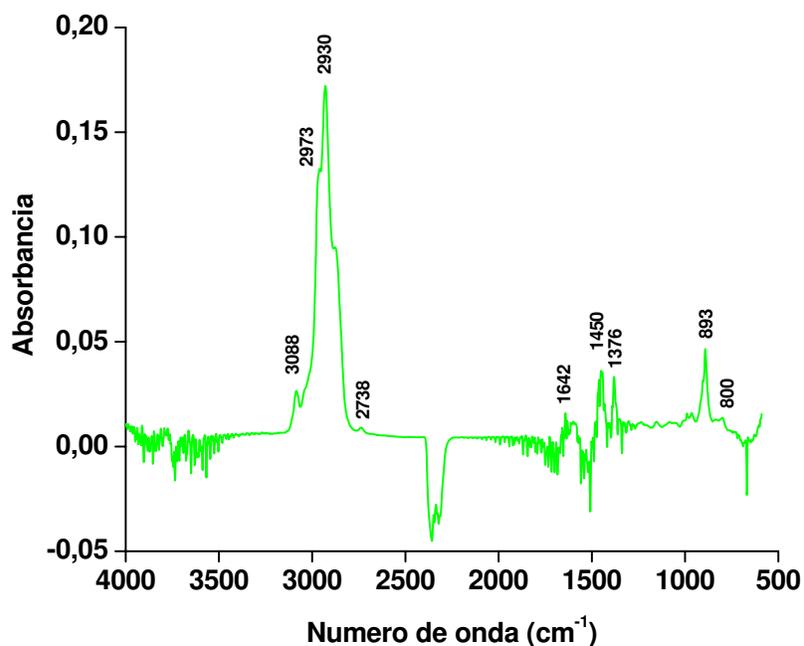


Figura 5 - Espectros extraídos da imagem em 3 dimensões à temperatura de 370°C

Diante do exposto, pode-se notar que essa ferramenta é extremamente interessante e potente, já que ela pode analisar não só o conteúdo, como também as ligações químicas dos subprodutos liberados durante todo o processo de reparação da cartilagem articular.

1.6 - Resposta da cartilagem ao estresse

Vários estudos têm mostrado alterações na macro e na micro estrutura da cartilagem articular. Destacam-se entre eles as modificações ocorridas na cartilagem articular de animais submetidos a estresse por imobilização (THAXTER et al., 1965; PALMOSKI, 1980; OHTA et al., 1981; KIVIRANTA et al., 1987; BEHRENS et al., 1989; CARTER, 1992; YAN e KERONG, 1995), por procedimento cirúrgico (DAVIS e MOSKOWITZ, 1973; SHAPIRO e GLIMCHER, 1980; LOVÁSZ et al., 1995; HAYAMI et al., 2006), por administração de drogas (TODHUNTER et al., 1993), ou por estresse mecânico (CATERSON e LOWTHER, 1978; SILVA et al., 1978; KIVIRANTA, 1988; KEMPSON, 1991; AROKOSKI et al., 1993; PALMER et al., 1995 b; TORZILLINI et al., 1997; PAP et al., 1998; CHEN et al., 2003).

THAXTER et al. (1965) estudaram os joelhos de 65 ratos, e os grupos foram assim distribuídos: experimental submetido a processo de denervação dos joelhos (G1), somente imobilizado e sem carga (G2), imobilizado com carga (G3) e denervado e imobilizado sem carga (G4). Os animais foram sacrificados após 15, 45 e 90 dias. No G2 foram observadas as maiores alterações (aplainamento de superfícies articulares, danos na celularidade e formações osteofíticas), que aumentaram progressivamente com o tempo de imobilização. Nos grupos G3 e G4 foram observadas as mesmas alterações, porém em menor proporção e, no grupo G1, poucas alterações foram encontradas. Em nenhum grupo foi encontrado fibrilação ou dissolução da cartilagem.

McDEVITT e MUIR (1976) estudaram as mudanças bioquímicas em cinco cães. Quatro deles foram submetidos à cirurgia com o objetivo de causar lesão na cartilagem articular do joelho direito e o quinto tinha osteoartrite natural. Todos os cães foram submetidos à uma hora de exercícios diários, sendo que os que tinham osteoartrite induzidas foram sacrificados um por vez, com 3, 6, 9 e 48 semanas de seguimento. O animal com osteoartrite natural foi sacrificado com 48 semanas. Os autores observaram lesão evolutiva da cartilagem articular com o passar das semanas e aumento da quantidade de ácido hialurônico e água nos cachorros com osteoartrite induzida, quando comparados aos animais controle.

A aplicação de estresse mecânico em joelho de ratos albinos, por meio de uma máquina de flexo-extensão passiva contínua, produziu aumento do líquido sinovial, perda de proteoglicanas após o quinto dia e alteração na espessura da cartilagem articular após o décimo (SILVA et al, 1978).

SALTER et al. (1980) compararam três grupos de 49 coelhos (40 jovens e 9 adultos), sendo um grupo submetido a exercícios passivos (G1), um grupo com as juntas imobilizadas (G2) e o terceiro submetido a exercícios ativos (G3). Todos os coelhos tinham lesões na cartilagem articular, causadas intencionalmente por cirurgia que simularam uma osteoartrite. Os animais foram sacrificados após 1, 2, 3 e 4 semanas de seguimento. Os autores observaram que o tipo de tratamento não influenciou no tamanho da superfície reparada, mas sim na qualidade do tecido de reparo. O tecido de reparo do G1 era de melhor qualidade, pois 75% dos defeitos possuíam tecido semelhante a cartilagem hialina. No G3, 25% dos defeitos possuíam tecido semelhante à cartilagem hialina e no G2, apenas 15% dos defeitos possuíam tecido semelhante à cartilagem hialina. Foi observado ainda que a diferença entre as idades dos coelhos não teve influência na qualidade do tecido de reparo.

OHTA et al. (1981) realizaram imobilização da pata posterior direita de coelhos com idades diferentes (um mês, um ano e 2,5 anos), por um período de três a nove semanas de seguimento, tendo observado que, nos grupos imobilizados com gesso, nenhuma alteração significativa foi notada no coelho jovem. No coelho adulto (1 ano), por outro lado, ocorreram alterações marcantes na superfície articular e na matriz intercelular (as fibras intercelulares não eram regulares e sim distribuídas desordenadamente na matriz). Além dessas alterações, os condrócitos dos coelhos velhos (2,5 anos) também estavam afetados depois de cinco semanas de imobilização. A cartilagem articular lesada do coelho adulto, que havia sido imobilizado por três semanas, recuperou-se, enquanto que a do coelho velho não obteve resposta reparadora.

KIVIRANTA et al. (1988) observou que exercícios de corrida em esteira com cães da raça Beagle promovem aumento da espessura da cartilagem e também da concentração de proteoglicanas, principalmente nas regiões sujeitas a cargas elevadas.

Em relação às alterações da cartilagem articular, aparentemente essas são dependentes do tipo de estresse aplicado. Embora o movimento da articulação seja de extrema importância para a manutenção da cartilagem articular (PALMOSKI 1980), o movimento anormal ou excessivo leva à mecanismo de degeneração da mesma, devido a má distribuição de força resultante sobre a superfície articular (KEMPSON, 1991). Portanto, o estresse mecânico pode induzir alterações estruturais no tecido cartilaginoso.

AROKOSKI et al. (1993) observaram os efeitos que longos exercícios de corrida em esteira rolante exercem sobre a espessura e o conteúdo de glicosaminoglicanas na cartilagem articular do joelho e da cabeça umeral de cães jovens. O protocolo constou de 40 semanas de exercícios, com elevação gradativa da esteira nas primeiras 25 semanas e depois estabilização até o final. Após análises biomecânicas, histológicas e microespectrofotométricas, constataram que houve redução significativa de glicosaminoglicanas nas áreas de maior carga da cartilagem articular, possivelmente devido à destruição de proteoglicanas. Entretanto, essa destruição não foi caracterizada como degeneração, pois pode ter sido parcialmente compensada pela neossíntese de moléculas. O estudo sugere ainda que, entre os componentes da cartilagem articular, o exercício com carga afeta primeiramente as proteoglicanas e, posteriormente, as fibras de colágeno.

CHATAN et al. (1993), observaram que os neutrófilos presentes no fluido sinovial, quando ativados por imunoglobulinas que estão presentes nas inflamações capsulares liberam uma descarga de substâncias oxidantes e proteases no líquido sinovial. Relatam também que os neutrófilos ativados são capazes de degradar tanto as proteoglicanas quanto o colágeno da cartilagem articular humana intacta.

TODHUNTER et al. (1993), por sua vez, estudaram o efeito de exercícios associados à infiltrações de glicosaminoglicanas polisulfatadas no carpo de pôneis. Os animais foram submetidos a uma cirurgia que induziu uma lesão na cartilagem articular, simulando uma osteoartrite. Seis animais de cada grupo receberam injeções intraarticulares de glicosaminoglicanas polisulfatadas. Observaram os autores que em todas as articulações exercitadas havia mais presença de colágeno tipo II, fibronectina e glicosaminoglicanas, do que as não exercitadas. As articulações não medicadas apresentaram melhor qualidade do tecido de reparo.

LOVÁSZ et al. (1995) avaliaram as mudanças histológicas em 30 coelhas adultas, com deformidades angulatórias da tíbia induzidas por meio de artrotomia para angulação em valgo. Após 12 semanas os autores observaram discreta hiper celularidade e desarranjo das colunas estruturais.

Degeneração da cartilagem articular também é evidenciada após procedimentos cirúrgicos, que resultam em diminuição da congruência articular e deformidade axial. Estas respostas foram encontradas quando se realizou osteotomia proximal da tíbia com angulação valga em coelhos, produzindo na cartilagem articular desses animais hiperplasia sinovial (devido à deformidade axial), desarranjo das colunas estruturais, aumento da fibrose sinovial e diminuição de glicosaminoglicanas (WU et al. 2005).

YAN e KERONG (1995) seccionaram e imobilizaram o tendão calcâneo esquerdo de 66 ratas, mantendo 22 sem secção e sem imobilização como controles. Os animais foram seguidos por uma até semana até 8 meses de pós-operatório. Ao microscópio óptico foram observadas lesões progressivas (superfície articular áspera, fibrilação, fissuras, erosão, desintegração e ulcerações) após dois meses de imobilização. Contudo, ao microscópio eletrônico foi observado que os condrócitos tinham corpos reduzidos (com diminuição de organelas citoplasmáticas) com um mês de imobilização e que as alterações progrediram após dois meses, chegando a processos de necrose com três meses de seguimento.

TORZILLINI et al. (1997) realizaram estudo em amostras de cartilagem articular retiradas do úmero de cão adulto, utilizando um sistema mecânico de testes para comprimir de forma estática e dinâmica a cartilagem articular. Para os ensaios de compressão estática e dinâmica foram utilizadas cargas de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 20 e 24 Mpa por períodos que variaram de 2 à 24 horas. Concluíram que a cartilagem articular responde a um aumento da carga (pressão), com diminuição da concentração de proteoglicanas e manutenção da quantidade de água na matriz cartilaginosa.

VISSER et al. (1998) observaram aumento da quantidade de Decorin na cartilagem articular de cães “Beagles” após exercício (corrida). Os autores utilizaram 10 animais para a realização de um protocolo de estresse, idêntico ao realizado por

AROKOSKI, 1993. Concluíram os autores que a cartilagem articular dos joelhos dos animais, tanto controle quanto experimentais, estavam intactas, e não foram encontradas alterações estruturais significantes na análise histológica. Além disso, o conteúdo de água e glicosaminoglicanas foram similares, tanto nos cães exercitados quanto nos controle, caracterizando uma fase de adaptação fisiológica.

Segundo WALKER (1998) forças aplicadas numa articulação tem alto potencial para promover mudanças degenerativas na sua cartilagem articular, as quais são inicialmente subclínicas e nem sempre produzem sintomas. O tipo de carga e a maneira com que ela é aplicada são importantes nessas mudanças. Impulsos repetitivos de carga são danosos para o osso subcondral e para a cartilagem articular e, quanto mais rápida a carga, maior a tensão, aumentando assim o potencial de dano. A cartilagem degenerada apresenta danos aparentes nas hélices das fibras de colágeno, com eventual desenrolamento, que se processa inicialmente nas linhas mais superficiais da cartilagem, progredindo para às linhas mais profundas.

CAMARGO FILHO et al. (1998) realizaram estudo sobre o efeito de movimentos passivos na cartilagem articular do joelho de ratos anestesiados, utilizando uma máquina de exercícios tipo biela-manivela. Os animais foram exercitados uma hora durante 15 dias e foram divididos em quatro grupos: exercícios com grande amplitude (80 ciclos/minutos), exercícios com pequena amplitude (80 ciclos/minuto), exercícios com grande amplitude (40 ciclos/minuto) e exercícios com pequena amplitude (40 ciclos/minuto). Os autores também observaram aumento no número de condrócitos e na espessura do tecido, principalmente nos ratos exercitados com a frequência de 80 ciclos/minuto. Pelos tipos de análises realizadas (histológica e morfométrica) não puderam concluir se alterações encontradas foram definidas como processos degenerativos da cartilagem articular.

O estresse mecânico na água foi estudado por CAMARGO FILHO et al. (1999). A cartilagem articular do joelho de ratos foi analisada após 15 sessões consecutivas de natação, uma por dia, de 30 minutos (G1) e 60 minutos (G2). Observaram os autores que os ratos submetidos a 60 minutos de natação possuíam maior número de condrócitos e aumento da espessura da cartilagem articular, quando comparado com o G1 e com o grupo controle. Entre os dois últimos grupos não houve diferenças significativas.

PATWARI et al. (2001) também investigaram os efeitos do estresse agudo sobre a cartilagem *in vitro*, tendo observado que na patogênese da osteoartrose as agressões sobre condrócitos, produzidos por estímulos mecânicos, podem resultar em apoptose e morte celular irreversíveis. Esses autores também demonstraram que a própria cápsula articular pode ter efeitos danosos importantes sobre a cartilagem, levando à sua degeneração.

D' LIMA et al. (2001), ao estudarem o efeito do trauma sobre a matriz e células da cartilagem hialina, observaram aumento significativo na apoptose do condrócito, quando a carga atingia entre 14 e 23 MPa, em comparação com controles.

Nessa linha de pensamento, HOMANDBERG (2001) avaliou a lesão da matriz da cartilagem hialina, produzida por produtos de degradação da matriz. O autor encontrou que fragmentos protéicos de matriz, como a fibronectina, podem aumentar a expressão das citocinas e suprimir a síntese de matriz, além de aumentar também a presença de metaloproteinases, que são substâncias encontradas comumente na osteoartrose.

O envolvimento das citocinas na lesão e no reparo da cartilagem hialina foi revisto por LOTZ (2001), que observou importante efeito estimulante dessas substâncias para a ativação do condrócito, resultando em uma resposta inflamatória articular, com lesão da própria cartilagem. A presença das citocinas, associadas à remodelação da matriz extracelular anormal, pode produzir lesão da cartilagem hialina.

Os mecanismos associados às alterações desencadeadas pela reação de estresse são determinados pelo tipo e intensidade do estímulo, tempo de aplicação desse estímulo e se o animal pode (ou não) escapar do estímulo que está sendo aplicado (MARCONDES et al., 1996).

Por outro lado, a imobilização, que resulta na diminuição do movimento articular e, conseqüentemente, em baixo estresse da cartilagem articular, também produz progressiva degeneração desta pela diminuição da atividade funcional dos condrócitos e pela falta da proliferação compensatória dos mesmos no estágio inicial do processo (YAN e KERONG, 1995; VANWANSEELE et al., 2002).

Recentemente RENNERT et.al (2006) estudaram, em ratos, o efeito do estiramento muscular passivo sobre a cartilagem articular do tornozelo, não imobilizada e imobilizada previamente. Concluíram que a imobilização, associada ao estiramento muscular, produziu redução dos proteoglicanos e aumento significativo da celularidade, que foi considerado como sinais precoces de um processo degenerativo ou, pelo menos, de risco para a cartilagem articular.

Para estudar os efeitos de estresse em animais de laboratório, induzidas pelo exercício físico, um dos modelos experimentais que podem ser utilizado é a utilização de esteira para ratos, que, além de representar um agente estressante pelo exercício físico, apresenta ainda um forte componente emocional, relacionado à novidade do estímulo (OSTMAN-SMITH, 1979; GARCIA-MARQUEZ e ARMARIO, 1987).

Levando-se em consideração que o exercício em esteira pode ser indicado na reabilitação de pacientes com problemas cardiocirculatórios, no condicionamento físico de pessoas sedentárias ou até no recondicionamento físico de atletas de alta performance, é importante que se analise o efeito desse tipo de equipamento sobre a cartilagem articular.



2- OBJETIVOS

2.1– Objetivo geral

O objetivo do estudo foi investigar o efeito da atividade em esteira rolante não inclinada, por uma hora diária (cinco dias por semana), durante 15, 30 e 60 dias, sobre a cartilagem hialina do joelho de rato.

2.2 – Objetivos específicos

- Analisar as alterações histológicas (desorganização celular, presença ou não de “clusters”, presença ou não de mitoses);
- Analisar a variação da espessura e número de condrócitos da cartilagem articular
- Analisar a variação do conteúdo de água na cartilagem articular



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animal de experimentação

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia*, *Mammalia*), com idade entre 150 e 180 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Campus de Botucatu – São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Estresse da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Unesp de Botucatu/SP, em gaiolas plásticas coletivas (30 x 16 x 19 cm), com no máximo cinco animais em cada gaiola (Figura 6). Esses animais permaneceram no biotério (sob temperatura média de $22 \pm 2C^{\circ}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, cujo ciclo claro iniciou-se às 7:00 horas) por pelo menos uma semana, antes de serem utilizados. A alimentação se baseou em ração padrão e água de torneira, fornecida a vontade.



Figura 6- Gaiola coletiva utilizada para alojar os animais

3.2- Equipamento

Os exercícios de corrida foram realizados em esteira rolante para animais de pequeno porte, construída no Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) de Presidente Prudente – SP, segundo projeto desenvolvido por ANDREW (1965). Essa esteira é composta por um motor elétrico (1480 rpm e 1/3 de Hp) com redutor de velocidade e uma esteira de lona com suporte de madeira, dividida em oito pistas, fechadas superiormente por vidro para evitar a fuga dos animais. A lona possui três metros de comprimento, fazendo com que os animais percorram um total de 9,75 metros por minuto, perfazendo 585 metros a cada sessão de 60 minutos. A metade anterior de cada uma das oito pistas tem suas laterais pintadas de preto, sendo cobertas por cartolina preta, fazendo com que essa região fique completamente escura. Essa medida é necessária, pois os animais tendem a fugir, procurando locais escuros (Figura 7).

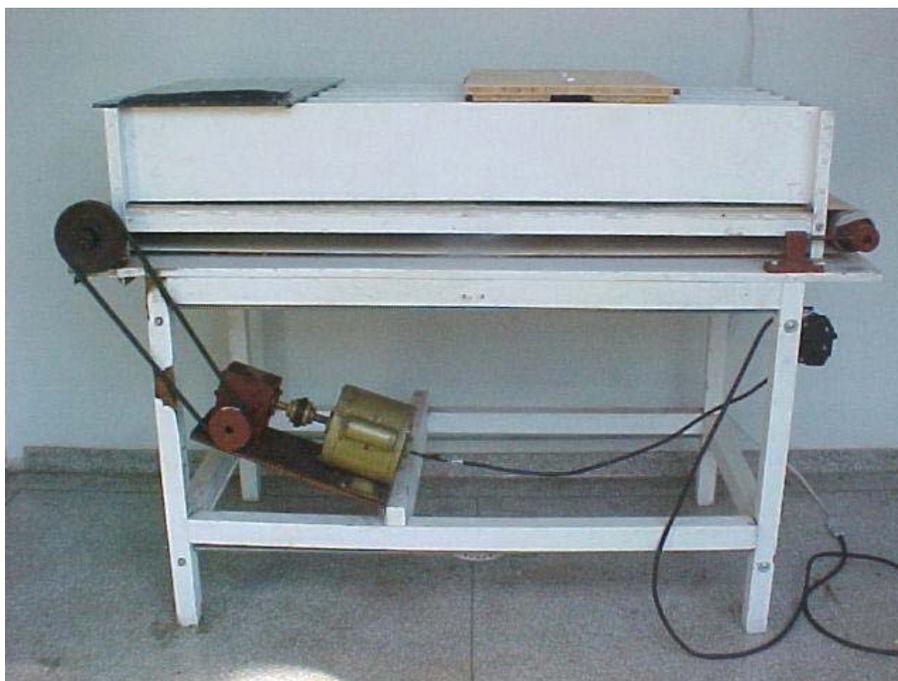


Figura 7 – Esteira rolante utilizada durante a realização dos experimentos.

3.3 – Procedimento experimental

Para a realização dos experimentos foram utilizados 30 animais, divididos em seis grupos, sendo três experimentais (GE), com cinco animais em cada grupo, submetidos a treinamento físico, e três grupos controle (GC), com quinze animais, não submetidos a treinamento físico. Todos esses animais foram pesados no primeiro dia do experimento.

Os animais do grupo experimental foram submetidos a um protocolo de treinamento, que consistiu de corrida diária em esteira rolante, com duração de 60 minutos por sessão. Esses animais foram sacrificados após 15 (GE-1), 30 (GE-2), e 60 (GE-3) dias de seguimento. Os animais do grupo controle também foram colocados em gaiolas plásticas coletivas (30 x 16 x 19 cm), com no máximo cinco animais em cada gaiola, permaneceram no biotério sob as mesmas condições dos animais dos grupos experimentais e também foram sacrificados de forma pareada com o grupo experimental.

3.4 - Protocolo de treinamento

Essa Pesquisa foi desenvolvida utilizando os mesmos animais e procedimentos da dissertação de mestrado intitulada "Influência do treinamento físico na resposta trófica do músculo sóleo e na resistência mecânica de tibia de ratos", cujos procedimentos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do campus de Ribeirão Preto, USP-SP. Protocolo número 04.1.810.53.9

Os animais do grupo experimental foram submetidos a um protocolo de treinamento que compreendeu duas fases: adaptação e experimental. Na **fase de adaptação**, que compreendeu os cinco primeiros dias de experimento, os animais foram submetidos a sessões diárias de corrida na esteira rolante, com duração de cinco, 15, 30, 45 e 60 minutos respectivamente. Na **fase experimental** os animais, após a referida fase de adaptação inicial, foram submetidos a sessões de treinamento na esteira rolante, segundo o grupo de seguimento ao qual pertenciam. Esse programa de treinamento consistiu de sessões diárias com duração de 60 minutos, cinco dias por semana. Ao término de cada sessão de treinamento físico, os animais foram recolocados em suas devidas gaiolas e, imediatamente após a última sessão de cada grupo, os ratos foram pesados e sacrificados para a coleta do material. A figura 8 mostra os animais realizando treinamento na esteira.



Figura 8 – Esteira rolante utilizada para a realização dos experimentos com os animais

A análise da evolução do peso dos animais foi feita de forma comparativa entre os diferentes grupos.

Para os demais estudos o grupo controle foi reduzido para sete animais escolhidos entre os 15 animais existentes. Desse modo foram selecionados dois animais dos grupos de 15 e 30 dias e 3 animais do grupo de 60 dias aleatoriamente. Os cêndilos laterais do joelho direito e esquerdo foram analisados pela microscopia óptica e pelo estereomicroscópio, respectivamente, enquanto que o cêndilo medial do joelho direito foi utilizado para a análise termogravimétrica e o do joelho esquerdo foi preservado.

A separação dos cêndilos lateral e medial do joelho direito foi feita imediatamente após a coleta, por meio de uma serra de fita para que o cêndilo medial pudesse ser encaminhado para Laboratório de Análise Térmica e Estrutural do Departamento de Física, Química e Biologia da FCT da Unesp - Presidente Prudente/SP, em gaze embebida em soro fisiológico. O cêndilo lateral era, por sua vez, fixado em solução de Carnoy para ser processado posteriormente.

Quanto ao joelho esquerdo, esse foi fixado em álcool a 70% por 24 horas e descalcificado em solução de ácido nítrico a 7%. Após a descalcificação, o côndilo medial era separado do lateral e o côndilo lateral submetido a um corte longitudinal, que passava pela sua região média. A face lateral seccionada do côndilo lateral, que correspondia à região média deste teve o seu contorno e espessura da cartilagem articular analisados pelo estereomicroscópio (Figura 9).

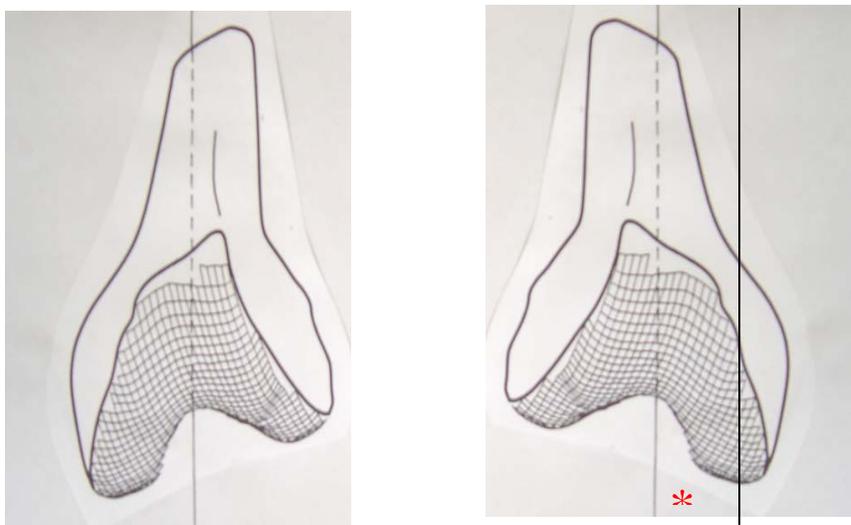


Figura 9- Esquema do joelho direito, onde está sendo mostrado o corte realizado para separação dos côndilos e esquema do joelho esquerdo onde está sendo mostrado o corte para separação dos côndilos e o segundo corte para retirada da face lateral do côndilo. O seguimento marcado com asterisco foi o observado pelo por meio do estereomicroscopia.

3.5- Preparo do Material Histológico

O côndilo lateral era fixado em solução de Carnoy por seis horas, iniciando-se em seguida o processo de descalcificação em ácido nítrico, em solução alcoólica a 2,5%, com troca diária da solução até que se considerasse apto a ser processado. A desidratação era realizada pela passagem da amostra em soluções alcoólicas de concentração crescente, seguindo-se a diafanização por xilol e inclusão em blocos de parafina. Foram obtidos cortes

em micrótomo rotatório com 6µm de espessura corados por Hematoxilina Eosina. Os 160 cortes analisados foram obtidos pelo método semi seriado, com a obtenção de um corte a cada nove cortes desprezados.

3.6 - Análise histológica

A análise das lâminas foi feita utilizando-se Microscópio da marca Leica modelo DMLB com objetiva de 10 para a obtenção de imagens panorâmicas e de 20 e 40 vezes para a análise dos detalhes morfológicos. As imagens foram arquivadas em um computador Pentium III acoplado a um sistema para captura (câmera Leica DC 300 F) e análise das imagens (IMAGE-PRO PLUS versão 4.5). Toda análise morfológica realizada a nível de microscopia óptica, levou em consideração os critérios da “International Cartilage Repair Society” (2002), citado por MAINIL-VARLET (2003). Essa avaliação foi feita pelo autor e por duas outras pessoas com experiência relativa na área histológica, supervisionados por um patologista.

3.7 - Análise Morfológica

Nessa análise levou-se em consideração a desorganização ou não das células nas camadas da cartilagem articular, incluindo a porção calcificada, o aumento ou não do número de mitoses e o aumento ou não dos “clusters”, em relação ao grupo controle. Essa análise foi realizada com objetiva de 20x.

3.7.1 - Contagem dos condrócitos

A contagem dos condrócitos (com objetiva de 10x) utilizou a ferramenta *Count-Size* do programa já mencionado. A contagem de condrócitos foi feita nos cortes selecionados de cada rato seguindo-se a seguinte rotina: foram identificadas três regiões na zona central da superfície articular (zona de carga), que ocupavam todo o retículo de enquadramento maior do campo visual do microscópio, com objetiva de 40x, e contava-se todos os condrócitos até a zona calcificada nessa área, excluindo-se as cavitações sem o condrócito (“cluster”). Nessa contagem foram incluídas a células da camada tangencial e as células em apoptose.

3.7.2 - Medida da espessura da cartilagem

A medida da espessura da cartilagem foi feita utilizando-se os mesmos cortes para a análise dos aspectos morfológicos e a contagem dos condrócitos. Após a devida calibração realizou-se a medida da espessura em nove pontos que foram selecionados aleatoriamente em três diferentes cortes de cada animal em cada grupo na zona central da superfície articular.

3.7.3 - Análise do contorno e da espessura da cartilagem pelo estereomicroscópio

A espessura e o contorno da superfície articular foram analisadas diretamente e após coloração com azul de anilina a 50% de forma comparativa entre os animais do grupo controle e do grupo experimental com 30 e 60 dias de esteira. Essa análise foi feita utilizando-se uma fatia seccionada na região média do côndilo lateral do joelho esquerdo com uma lupa estereotóxica da marca Leica, modelo MZ 16. Essa análise subjetiva foi feita a partir da coleta de imagens digitalizadas que foram comparadas entre si observando-se a redução da espessura e a presença de irregularidades na superfície da cartilagem articular.

Todos os dados obtidos foram tabulados no programa Excell e analisados do ponto de vista estatístico por testes não paramétricos (Prova U de Mann Whitney e teste de Kruskall Wallis), considerando-se significativo valor de p igual ou menor que 0,05.

3.8 - Análise termogravimétrica (TGA)

Para análise da cartilagem utilizou-se o equipamento da marca NETZSCH modelo 209, na faixa de temperatura ambiente até 300°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C por minuto (Figura 10)



Figura 10 – Equipamento de Análise termogravimétrica (TGA) acoplado ao equipamento de espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier, marca Bruker modelo Vector 22.

Para análise da cartilagem, era colocado em um pequeno recipiente de alumina, acoplada a uma balança de precisão (10^{-6}) em atmosfera de nitrogênio um fragmento de cartilagem com peso de 8mg. Esse fragmento era obtido da região central da superfície articular com o mínimo de tecido ósseo possível. Esse fragmento era submetido à variação progressiva e constante de temperatura (graus Celsius), registrando-se a perda da massa (grama) durante todo o processo de aquecimento. Os produtos voláteis liberados pelo aquecimento eram analisados quanto à sua composição e ligações químicas, em função da deformação do feixe de radiação infravermelho emitido contra essas substâncias voláteis e registrado em uma curva de absorvância pelo número de ondas. Desse modo, obtinham-se gráficos da variação massa (Δm) expressa em percentagem no eixo vertical (ordenada) e a temperatura (T) em graus Celsius no eixo horizontal (abscissa), assim como gráficos da absorvância na ordenada pela frequência de ondas na abscissa. A porcentagem de perda de massa nas diversas amostras foi analisada estatisticamente utilizando-se a prova teste U-Mann Whitney, considerando-se p menor ou igual a 0,05.



4- RESULTADOS

Na semana de adaptação os animais ficaram agitados ao serem colocados na esteira e tentavam fugir da mesma. Para evitar a fuga foi necessário colocar um anteparo superior, que ocupava todo o local de treinamento dos ratos, que consistia de 8 módulos independentes. Com a progressão do treinamento, os animais se adaptaram e reduziram a agitação.

Para o treinamento foram selecionados os animais que melhor se adequaram à esteira durante o período de adaptação, sendo que os demais foram utilizados para formação do grupo controle. Em relação à intensidade com que os animais executavam a atividade na esteira, foi observado que alguns a realizavam continuamente, seguindo a velocidade da esteira, enquanto que outros a executavam com maior velocidade, de forma intermitente, intercalando breves intervalos de tempo, até se chocassem na parede posterior da esteira.

Observou-se também que, devido ao estresse físico, alguns animais passavam a se arrastar após a metade do treinamento e, por algumas vezes, prendiam a cauda entre a lona e a parede final, sendo necessária intervenção manual mediante o reposicionamento do animal para correta execução do exercício.

Outro fato observado foi que certos animais se posicionaram espontaneamente em sentido contrário àquele estabelecido, de forma a executar o treinamento por alguns instantes em “marcha ré”. Nestas ocasiões, os animais demonstravam-se mais agressivos.

Com exceção destas circunstâncias, o período de treinamento transcorreu sem intercorrências.

4.1 - Análise do peso Corporal

4.1.1 - Peso Inicial

A tabela 1 mostra os valores individuais do peso inicial dos animais dos grupos experimental e controle, utilizados no experimento.

Tabela 1- Apresentação dos valores individuais de massa corporal (em gramas) dos animais do grupo experimental e controle no início do estudo

ANIMAL	GE1	GE2	GE3	GC1	GC2	GC3
1	242	271	266	203	230	234
2	221	242	229	255	248	255
3	207	211	207	223	275	235
4	263	221	242	242	213	233
5	257	248	248	271	224	237
Média	238,0	238,6	238,4	238,8	238,0	238,8
DP	10,6	10,5	9,85	11,9	10,8	4,10

Legenda: G = grupo, E = experimental, C= controle, DP = desvio padrão

A comparação do peso inicial dos animais dos grupos experimental e controle mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=1,0$).

4.1.2- Peso Final

Ao final do período de seguimento, os animais foram novamente pesados e não houve diferenças significativas entre os grupos controle e experimental ($p=0,43$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Apresentação dos valores individuais de massa corporal (em gramas) dos animais do grupo experimental no final do estudo

ANIMAL	GE1	GE2	GE3	GC1	GC2	GC3
1	318	354	489	333	319	378
2	364	315	375	283	355	365
3	322	395	373	387	358	370
4	312	322	337	330	385	350
5	310	292	404	318	402	380
Média	352,2	335,6	375,6	330,8	363,8	376,6
DP	9,9	17,9	25,7	16,8	14,2	23,6

Legenda: G = grupo; E = experimental, C = controle, DP = desvio padrão

4.2 - Análise histológica da cartilagem articular

4.2.1 - Coloração por HE

Na Tabela 3 são apresentados os dados qualitativos obtidos na análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle.

Tabela 3- Apresentação dos dados qualitativos obtidos na análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle

<i>GRUPO</i>	<i>Organização celular</i>	<i>Cluster</i>	Mitoses
Controle	Sim	Raros	Raros
Controle	Sim	Raros	Freqüentes
Controle	Sim	Raros	Raros
Controle	Sim	Raros	Raros
Controle	Sim	Raros	Raros
Controle	Sim	Raros	Raros
Controle	Sim	Raros	Raros
GE1	Não	Freqüentes	Raros
GE1	Não	Freqüentes	Freqüentes
GE1	Sim	Freqüentes	Freqüentes
GE1	Sim	Raros	Raros
GE1	Não	Raros	Raros
GE2	Sim	Freqüentes	Freqüentes
GE2	Sim	Freqüentes	Freqüentes
GE2	Não	Freqüentes	Raros
GE2	Não	Freqüentes	Freqüentes
GE2	Não	Raros	Freqüentes
GE3	Não	Raros	Freqüentes
GE3	Não	Raros	Freqüentes
GE3	Não	Raros	Freqüentes
GE3	Não	Raros	Freqüentes
GE3	Sim	Freqüentes	Freqüentes

Legenda: G = grupo, E = Experimental

Na figura 11 são apresentados a distribuição dos dados acima para cada parâmetro considerado. Para o item organização celular foi observado que houve um número significativamente maior de casos de falta de organização nos grupos GE2 e GE3.

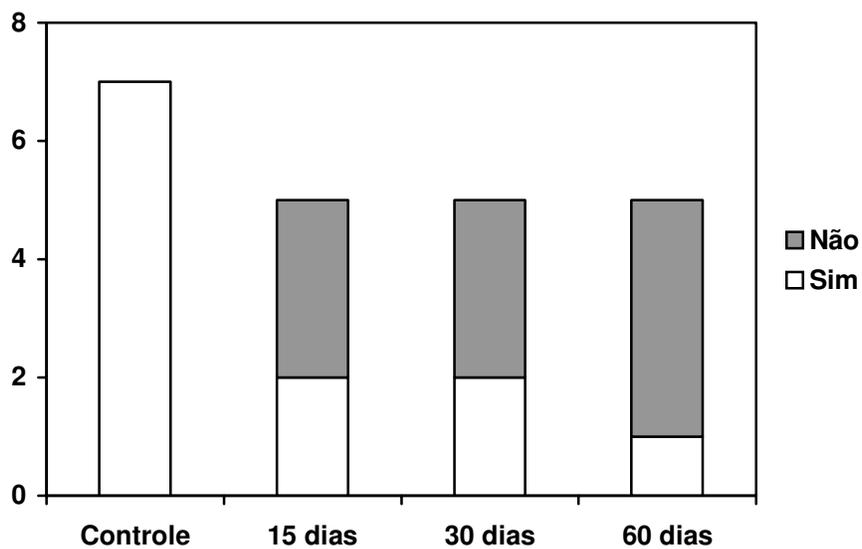


Figura 11- Apresentação da análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle, em função da organização celular

Para o encontro de “clusters”, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 12).

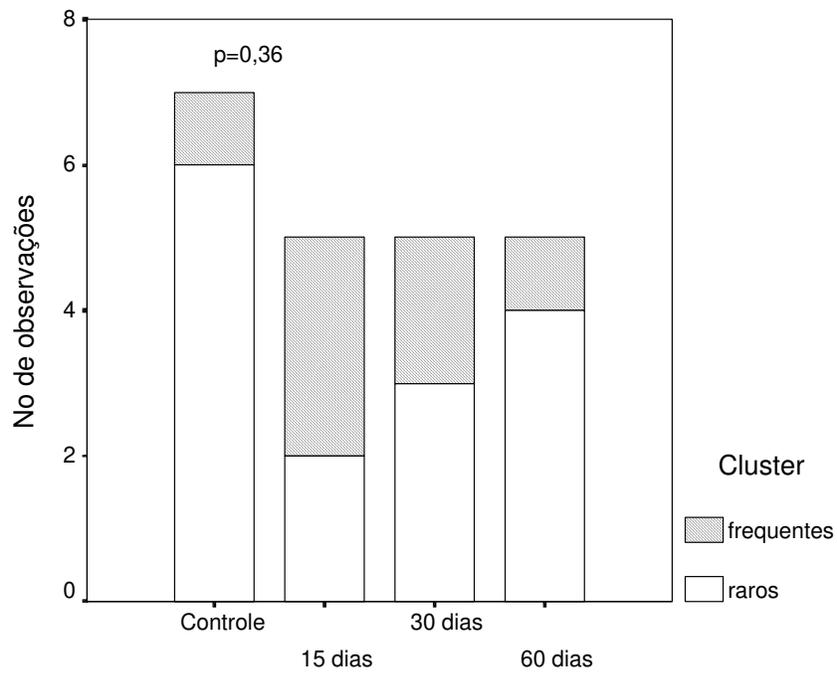


Figura 12- Apresentação da análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle, em função do número de “cluster”

No entanto a freqüência de encontro de mitoses foi significativamente maior no grupo experimental do que no controle, especialmente para o grupo GE3 (Figura 13)

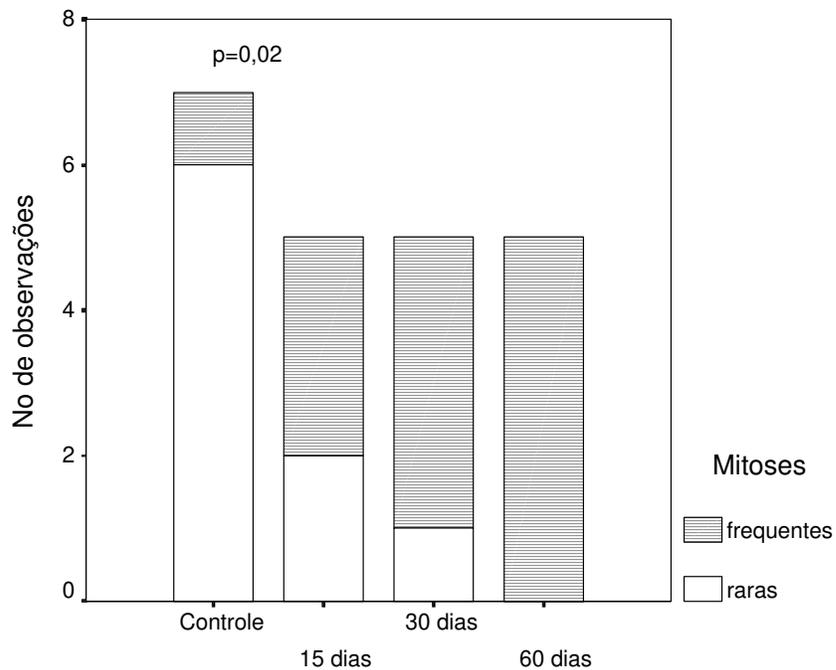


Figura 13- Apresentação da análise morfológica das lâminas dos animais dos grupos experimental e controle, em função da mitose celular

4.3 – Morfometria

4.3.1 - Espessura da cartilagem

Os resultados das medidas da espessura da cartilagem articular de cada um dos animais e as respectivas médias aritméticas são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4- Apresentação da mensuração da espessura da cartilagem articular dos animais do grupo experimental e controle e as respectivas médias aritméticas para cada animal (mm)

Animal	Ep1	Ep2	Ep3	Ep4	Ep5	Ep6	Ep7	Ep8	Ep9	Médias
Controle	,12	,12	,16	,17	,15	,15	,16	,16	,17	,15
Controle	,14	,22	,16	,19	,12	,20	,19	,16	,14	,17
Controle	,13	,09	,09	,11	,11	,11	,10	,08	,07	,10
Controle	,11	,10	,08	,13	,10	,12	,16	,12	,19	,12
Controle	,16	,11	,11	,18	,14	,16	,14	,12	,11	,14
Controle	,11	,13	,11	,16	,10	,11	,13	,11	,11	,12
Controle	,13	,11	,10	,11	,13	,12	,14	,11	,12	,12
GE1	,08	,09	,09	,12	,09	,11	,07	,11	,11	,10
GE1	,17	,14	,12	,14	,15	,13	,17	,13	,12	,14
GE1	,11	,18	,13	,11	,13	,13	,13	,12	,11	,13
GE1	,14	,15	,14	,14	,11	,13	,11	,12	,14	,13
GE1	,11	,11	,09	,10	,14	,09	,11	,16	,16	,12
GE2	,12	,14	,11	,13	,13	,08	,14	,12	,11	,12
GE2	,16	,13	,06	,19	,12	,07	,16	,13	,07	,12
GE2	,11	,13	,08	,10	,11	,08	,13	,13	,07	,10
GE2	,12	,11	,08	,09	,12	,12	,12	,15	,18	,12
GE3	,11	,08	,08	,09	,09	,08	,09	,09	,10	,09
GE3	,09	,11	,09	...	,10	...	,09	,10	,12	,10
GE3	,11	,12	,09	,10	,08	,10	,10	,11	,11	,10
GE3	,09	,08	,13	,08	,10	,10	,10	,07	,08	,09
GE3	,11	,10	,12	,11	,10	,13	,10	,14	,12	,11

Legenda: G = Grupo, E= Experimental; Ep = Espessura

Pode-se observar que os valores do grupo GE3 foram significativamente menores que os dos demais grupos. Não houve diferenças significativas entre o GC e os GE1 e GE2 (Tabela 5 e Figura 14).

Tabela 5- Apresentação das médias da espessura dos grupos controle e experimental

	Espessura média (mm)			
	Controle	15 dias	30 dias	60 dias
	0,15	0,10	0,12	0,09
	0,17	0,14	0,12	0,10
	0,10	0,13	0,10	0,10
	0,12	0,13	0,12	0,09
	0,14	0,12		0,11
	0,12			
	0,12			
Média	0,13	0,12	0,11	0,09
Mediana	0,12	0,13	0,12	0,10
DP	0,02	0,01	0,008	0,009

Legenda: DP = desvio padrão, mm - milímetro

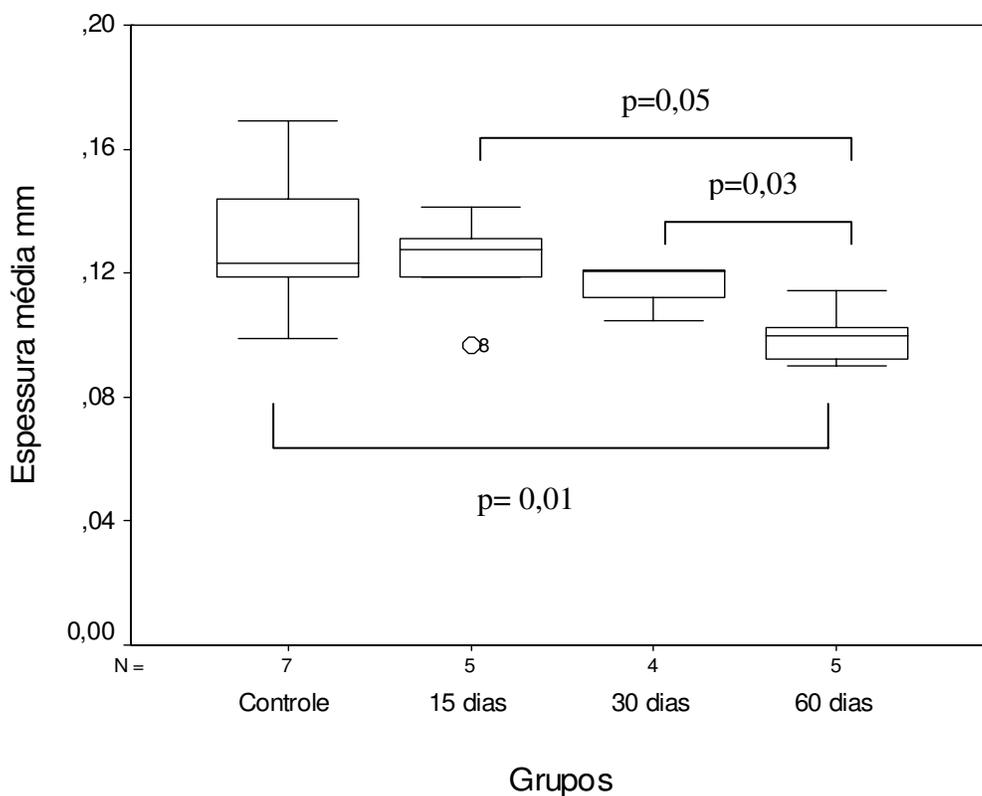


Figura 14- Apresentação em box-plot da espessura média em milímetros da cartilagem do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por 15, 30 e 60 dias

4.3.2- Contagem dos condrócitos

Os resultados da contagem dos condrócitos da cartilagem articular de cada um dos animais e as respectivas médias aritméticas são apresentados na tabela 6. Pode-se observar que os valores dos grupos GE1, GE2 e GE3 foram significativamente maiores que os do grupo controle (Tabela 7 e Figura 15).

Tabela 6- Apresentação das medidas do número de condrócitos do cõndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por, 15, 30 e 60 dias e de suas respectivas médias aritméticas.

<i>GRUPO</i>	<i>Medida 1</i>	<i>Medida 2</i>	<i>Medida 3</i>	Média das medidas 1, 2, 3
Controle	78	80	76	78,00
Controle	59	56	55	56,67
Controle	72	78	70	73,33
Controle	78	73	54	68,33
Controle	71	78	71	73,33
Controle	57	63	65	61,67
Controle	66	86	79	77,00
GE1	69	59	68	65,33
GE1	120	111	116	115,67
GE1	83	114	103	100,00
GE1	112	101	100	104,33
GE1	111	106	106	107,67
GE2	119	112	115	115,33
GE2	112	107	105	108,00
GE2	113	110	100	107,67
GE2	103	100	118	107,00
GE3	109	104	102	105,00
GE3	114	109	104	109,00
GE3	100	107	106	104,33
GE3	132	109	106	115,67
GE3	101	99	111	103,67

Legenda: G = Grupo, E = Experimental

Tabela 7- Apresentação da média, mediana e desvio padrão do número médio de condrócitos do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício em esteira por 15, 30 e 60 dias.

	Número de condrócitos			
	Controle	15 dias	30 dias	60 dias
	78	65	115	105
	56	115	108	109
	73	100	107	104
	68	104	107	115
	73	107		103
	61			
	77			
Media	69	98	109	107
Mediana	73	104	108	105
DP	8	19	3	4

Legenda: DP = desvio padrão

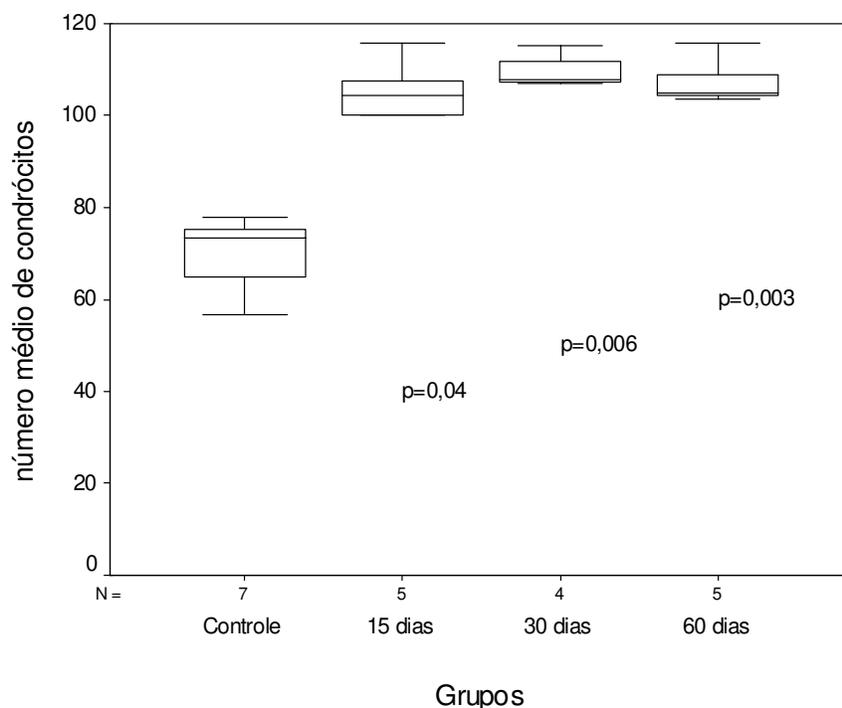


Figura 15- Apresentação em box-plot da contagem de condrócitos da cartilagem do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por 15, 30 e 60 dias.

4.4 – Termogravimetria (TGA)

Pela técnica de acoplamento simultâneo de TG/FT-IR, todos os gases emitidos da amostra em função da temperatura, no TG, são canalizados para o espectrômetro (FT-IR), onde são caracterizados simultaneamente no intervalo de número de ondas entre 4000 e 400 cm^{-1} . No final da medida, o software junta todos os espectros do FT-IR e gera uma imagem em 3 dimensões. As amostras de cartilagem sofreram aquecimento progressivo da temperatura ambiente até 300°C.

Abaixo estão apresentados os gráficos TG, a imagem tridimensional resultante da análise de TG-FTIR para o rato 1 do GE 1 (Figura 16) e o gráfico do espectro do infravermelho do gás evaporado do TG à temperatura de 160 °C de todo o grupo GE1 (Figura 17).

No gráfico TG são observadas duas linhas: uma sólida e preta, que mostra a variação da perda de massa em função da temperatura pontilhada, e outra vermelha, que é a derivada da curva TG. O primeiro vértice da linha derivada (vermelha) mostra em qual temperatura ocorreu a maior perda do material existente na cartilagem sob a forma de vapor. No ponto em que essa derivada atinge um platô traça-se uma perpendicular, que indica a temperatura na qual a reação química (vaporização) se estabilizou. Nesse ponto, na linha preta é determinada a perda de massa da amostra. Na imagem tridimensional correspondente observa-se a presença de um primeiro pico de ondas ao redor de 1600 cm^{-1} , que é característico da água e de ligações químicas do tipo OH. Os outros picos podem ser caracterizados como carbono resultante da queima de material carbônico (C=C) e de materiais com anéis aromáticos.

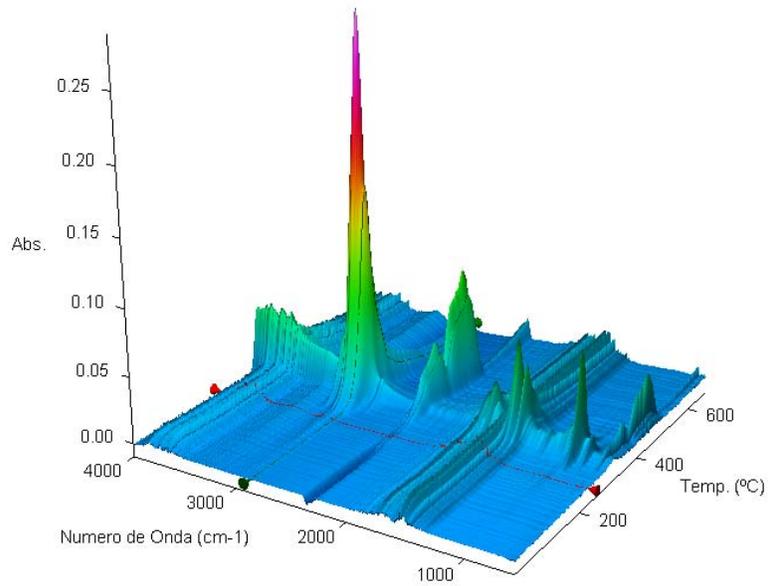
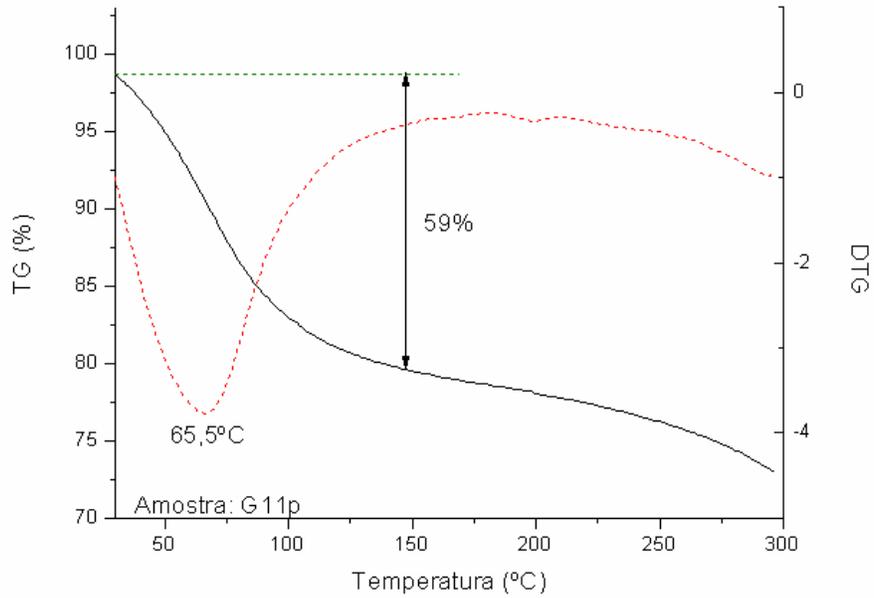


Figura 16- Apresentação da curva TG e da imagem tridimensional correspondente resultante da análise de TGA-FTIR do fragmento de cartilagem do rato1 do grupo GE1 (15 dias de esteira).

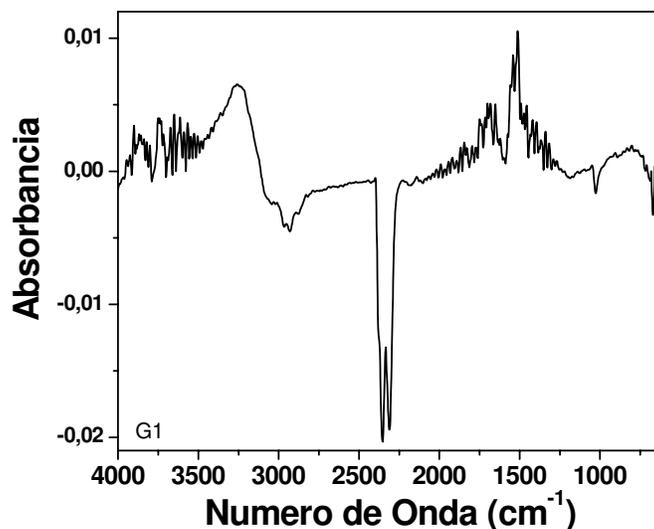


Figura 17- Apresentação do espectro do infravermelho do gás evaporado do TG, à temperatura de 160 °C, de todo o grupo 1 (15 dias de esteira)

A partir destes gráficos foram obtidos os valores de cada amostra de cartilagem dos animais em cada grupo, que estão abaixo relacionados com as respectivas médias aritméticas por grupo e os desvios padrão.

Tabela 8 - Apresentação dos valores individuais, das média aritméticas e dos desvio padrão da porcentagem de perda de água obtidos pela termogravimetria no grupo controle e nos grupos com 15 30 e 60 dias de esteira

<i>Animais</i>	<i>Controle</i>	<i>GE1</i>	<i>GE2</i>	GE3
R1	36%	41%	44%	45%
R2	30%	39%	38%	37%
R3	29%	27%	27%	29%
R4	36%	35%	38%	40%
R5	30%	34%	36%	38%
Média	32,2%	32,6%	36,5%	37,8%
DP	3,4	6,4	6,6	5,8

Legenda: G = Grupo; E = Experimental, R = rato, DP = desvio padrão

A partir desses valores foi feito um gráfico do tipo “box-plot” e a análise estatística que evidenciou que apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos estudados houve tendência ao maior acúmulo de água nas cartilagens dos animais com maior tempo de esteira.

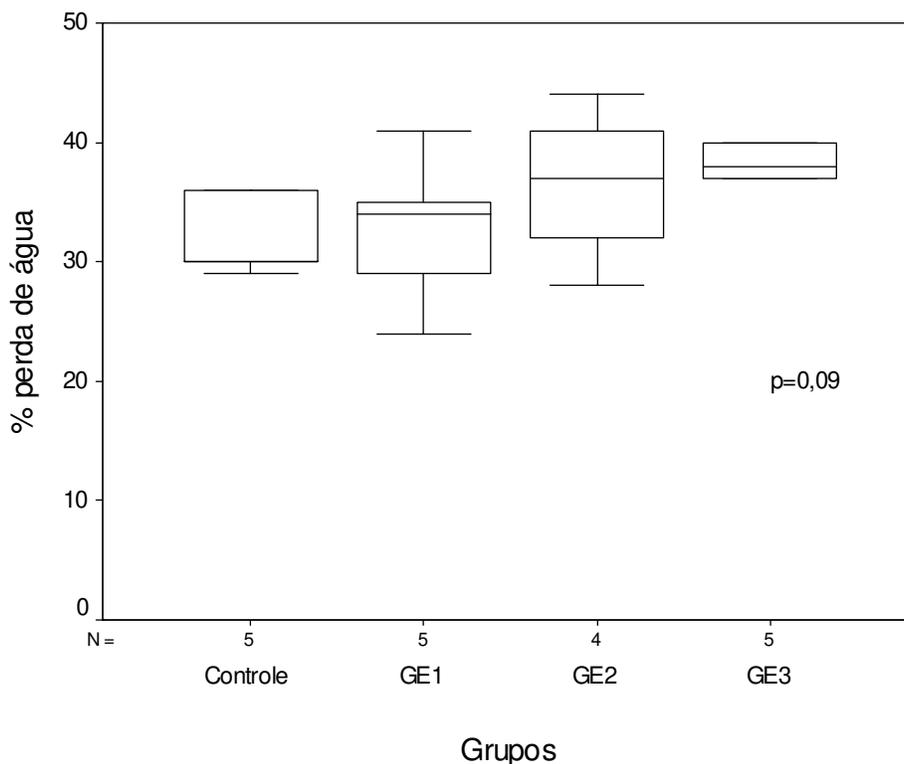


Figura 18- Apresentação em “box-plot” da porcentagem de perda de água da cartilagem do côndilo lateral dos fêmures dos animais controle e dos animais submetidos ao exercício na esteira por, 15, 30 e 60 dias.

4.4.1 - Avaliação pelo estereomicroscópio

Abaixo estão apresentadas as imagens obtidas com o estereomicroscópio do contorno da superfície articular de animais do grupo controle, com 15, 30 e 60 dias de exercício na esteira. Observa-se perda progressiva do contorno normal da cartilagem articular, assim como da sua espessura, nos animais com maior tempo de atividade física. (Figuras 19 a 23)

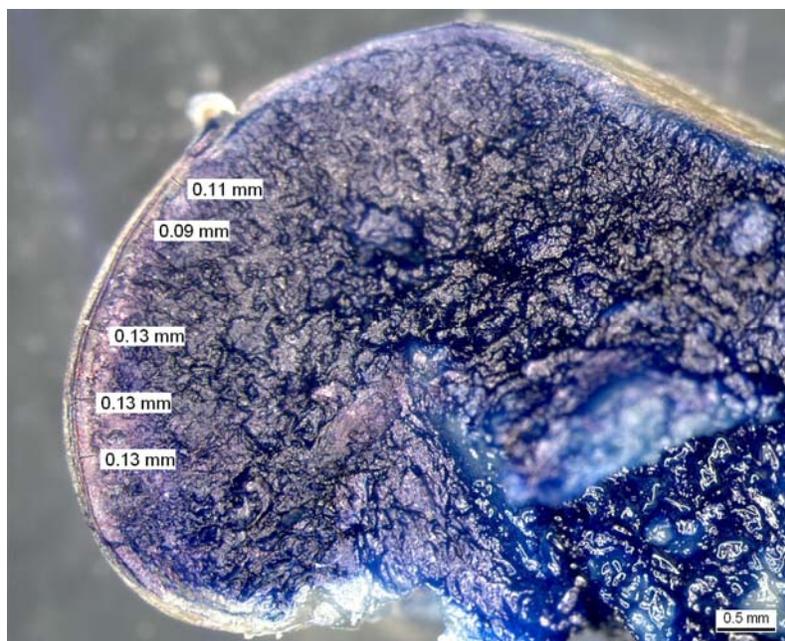


Figura 19- Imagem da superfície articular de um fragmento do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 6 do grupo controle corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno da superfície regular da cartilagem articular e as medidas da espessura em diversos locais de carga

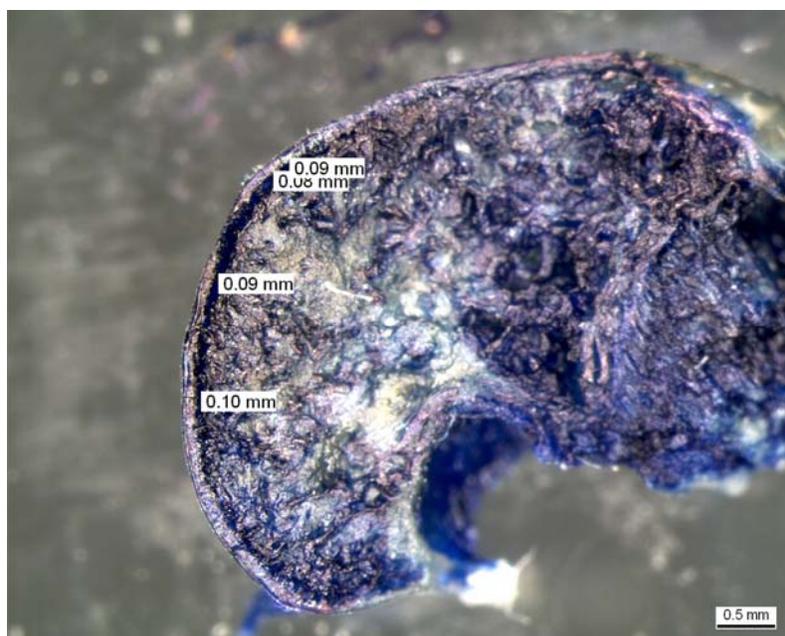


Figura 20- Imagem da superfície articular de um fragmento do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 7 do grupo controle corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno da superfície regular da cartilagem articular e as medidas da espessura em diversos locais de carga

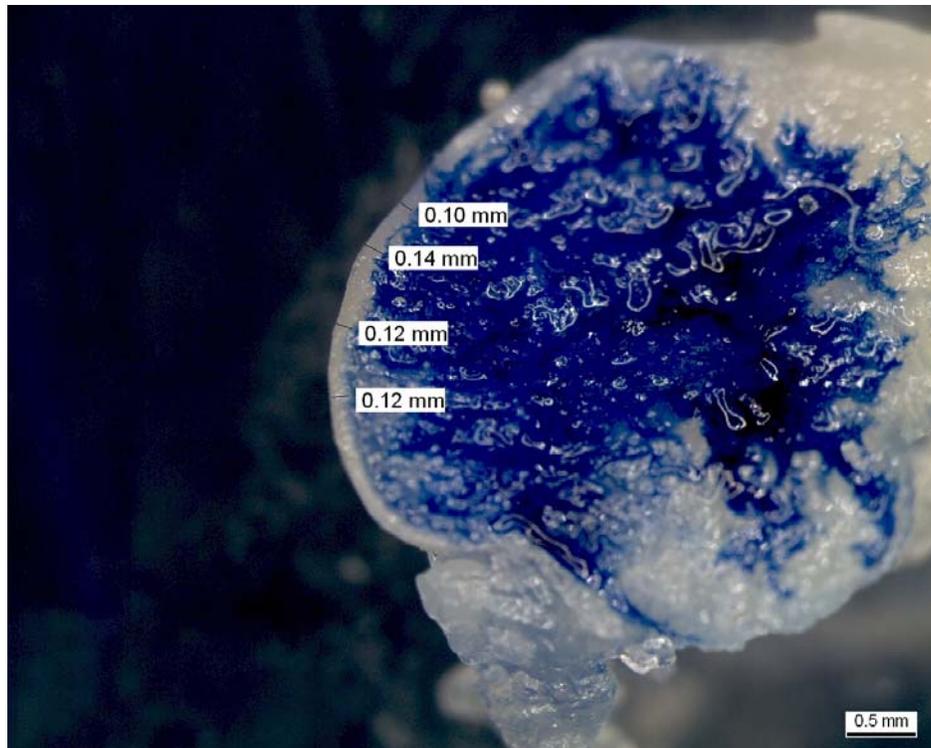


Figura 21- Imagem da superfície articular de uma fatia do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 2 do grupo experimental (15 dias) corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno regular da superfície da cartilagem articular e as medidas da espessura semelhante ao controle em diversos locais de carga

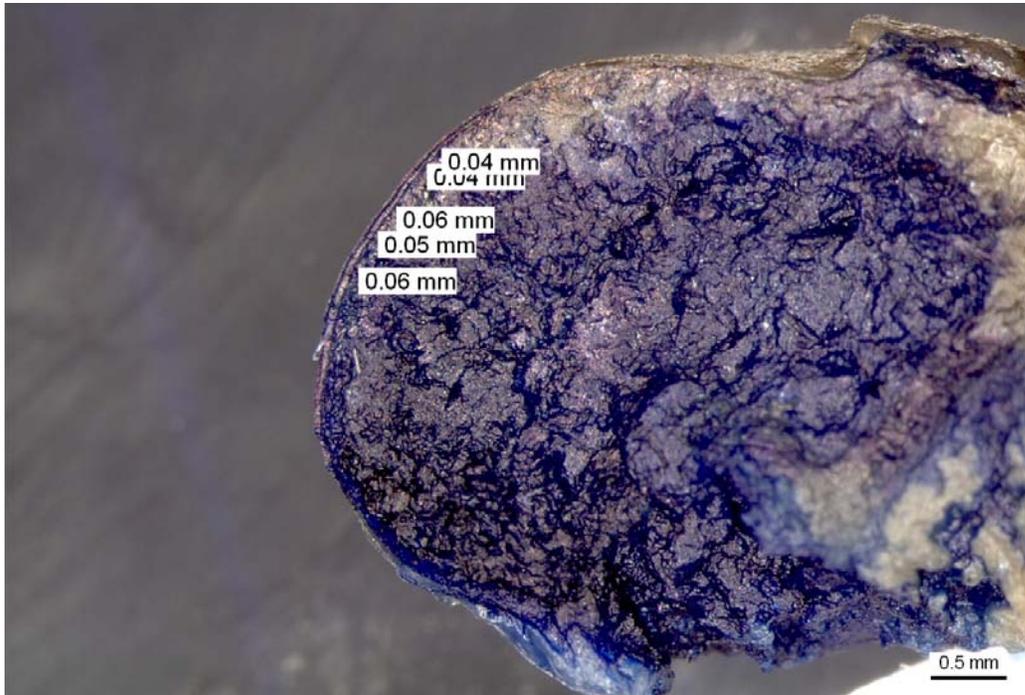


Figura 22- Imagem da superfície articular de uma fatia do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 1 do grupo experimental (30 dias) corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno irregular da superfície da cartilagem articular e redução da espessura da cartilagem em diversos locais de carga

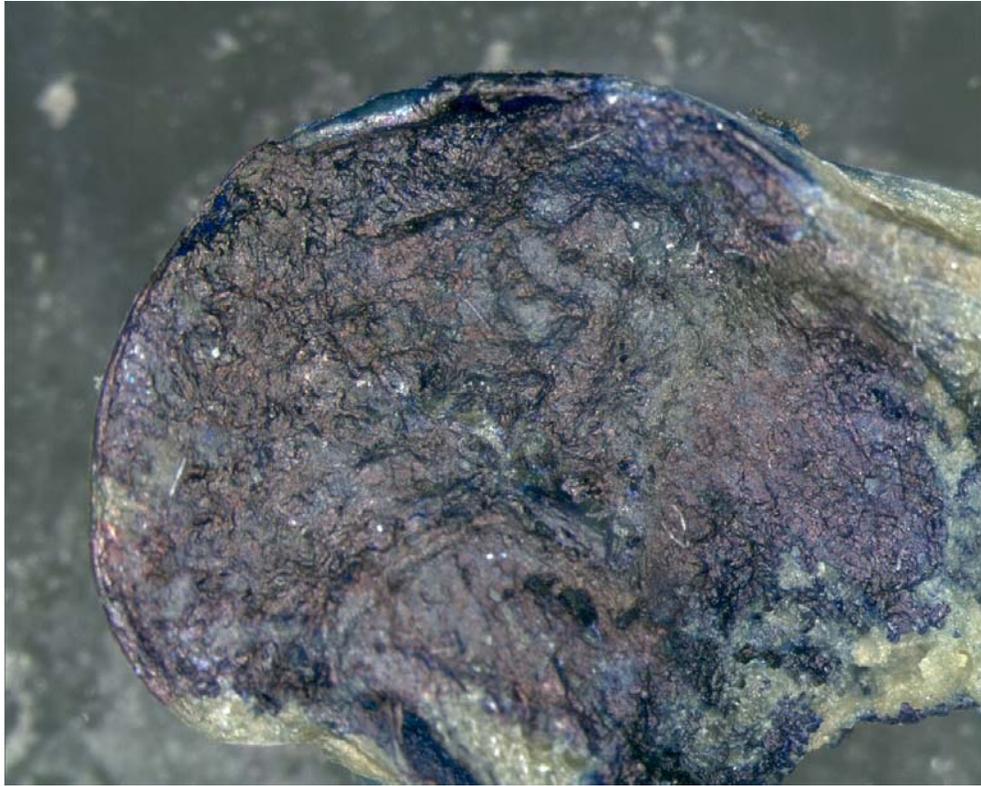


Figura 23- Imagem da superfície articular de uma fatia do côndilo lateral do joelho esquerdo do rato 4 do grupo experimental (60 dias) corado com azul de anilina a 50%, com aumento de 16x, onde se observa o contorno irregular da superfície da cartilagem articular e redução da espessura da cartilagem em diversos locais de carga



5- DISCUSSÃO

Acreditava-se que a osteoartrite era uma doença caracterizada pelo “desgaste e ruptura”, ou seja, era uma doença causada unicamente por forças mecânicas que levavam à degradação da articulação, independente da resposta biológica. Entretanto, como em todo tecido vivo, hoje se sabe que a reação da cartilagem articular ao trauma segue uma seqüência de eventos que envolve o aumento do conteúdo de água, degradação da matriz por enzimas endógenas, apoptose celular e necrose, seguidas por perda dos seus constituintes para o espaço articular, desencadeando uma resposta inflamatória junto ao tecido sinovial.

Essa doença articular, caracterizada por progressiva falência bioquímica da cartilagem hialina, alterações tróficas do osso subcondral e presença de sinovite em grau leve ou moderado (LOHMANDER, 2000) é acompanhado por uma tentativa de reparação, onde observa-se aumento da atividade mitótica celular, aumento do número de células e da matriz extra-celular, buscando a sua reparação.

Embora os detalhes da patogênese permaneçam ainda obscuros, essa doença envolve um complexo de causas multifatoriais que atuam sobre o catabolismo e anabolismo da cartilagem hialina, assim como nos outros tecidos existentes na articulação, como a membrana sinovial, o osso subcondral e até os tendões e ligamentos (HAYAMI et al., 2006).

Até o momento, não há tratamento que modifique substancialmente a história natural da osteoartrite, a não ser condutas sintomáticas que aliviam a dor ou melhoram temporariamente a função articular.

Nesse sentido, são importantes os estudos experimentais realizados em animais de laboratório, que permitam o entendimento de forma minuciosa dos diversos fatores intervenientes na gênese da osteoartrite.

Por ser um tecido avascular e aneural, o condrócito da cartilagem articular recebe poucas informações por via humoral e imunológica do restante do corpo. Existem evidências muito fortes de que essas células são extremamente sensíveis à pressão ou à deformação e que alterações desse tipo atingem a sua membrana celular e modificam o seu

metabolismo. Assim sendo, a carga e o bombeamento do fluído sinovial e da água no interstício da matriz intercelular parecem ser os principais estímulos para promover alterações bioquímicas na cartilagem e nas suas propriedades biomecânicas. Como os condrócitos absorvem essas informações mecânicas do meio e as convertem em alterações específicas, expressadas pelos seus genes no seu núcleo, é ainda um assunto pouco conhecido, embora existam indícios de que as integrinas, moléculas que estão na membrana plasmática e no citoplasma intracelular, estejam envolvidas. Provavelmente, esta transdução do sinal mecânico ao núcleo dirige a síntese de proteínas específicas, pelo estímulo e expressão do RNA mensageiro (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015; MANKIN et al, 2000).

Desse modo, tanto o movimento articular como a carga sobre a cartilagem hialina são essenciais para manter a composição, estrutura e propriedades desse tecido. A quantificação exata do tipo, da intensidade e da frequência da carga, necessários para manter a função articular normal, ainda são motivos de estudo e especulação. De qualquer modo, quando a frequência da carga excede os valores considerados fisiológicos, o balanço entre síntese e a degradação se alteram, modificando assim a composição e a microestrutura da cartilagem (MANKIN et al, 2000).

Observações clínicas em estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que cargas aplicadas sobre as articulações, assim como o próprio movimento, têm efeito sobre o metabolismo da cartilagem articular, que responde de forma diferente dependente do tipo de carga, se estática ou intermitente, da intensidade da carga, da frequência de aplicação e das forças intermitentes (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015)..

Experiências *in vitro* com discos de cartilagem submetidos a esforços mecânicos resultaram em estímulo de até 20 a 40% da síntese de glicosaminoglicanos. Isso ocorre principalmente quando se produz compressões, cuja amplitude varia de 1 a 5%, com frequência de 0,01 a um ciclo por segundo. Com frequências menos intensas (de 0,0001 a 0,001 ciclo por segundo) o efeito cessa e há saída de líquido da cartilagem (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015).

Por outro lado, se o disco de cartilagem é mantido sob compressão estática, há redução do conteúdo do líquido intersticial, demonstrada pela redução da incorporação do marcador radioativo em até 20% (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015). Compressões freqüentes de grande amplitude, aplicadas durante duas horas, podem, por outro lado, alterar a rede de colágeno, permitindo assim a diminuição da pressão intracompartimental, perda dos agregados de proteoglicanos e de água, resultando em lesões irreversíveis da cartilagem (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015).

Estudos *in vivo* mostram que a imobilização completa de um membro provoca a redução da espessura da cartilagem, assim como diminuição do conteúdo e da síntese de proteoglicanos, facilitando a perda da água. A reativação da função desse membro, com carga normal e exercícios moderados, restabelece, em parte, o conteúdo dos proteoglicanos e as alterações bioquímicas existentes (KIVIRANTA et al., 1987; KIVIRANTA et al, 1992; KING et al., 2005;).

Cargas excessivas ou exercícios exagerados, pelo contrário, acarretam degradação da matriz, redução do tamanho dos proteoglicanos, da sua capacidade para formar os agregados, desorganização das fibras de colágeno, perda de água e degeneração articular (NEWTON et al., 1997; KIVIRANTA et al., 1988).

Nas últimas duas décadas, modelos animais têm sido muito utilizados para aumentar o entendimento desse tema, principalmente com relação aos eventos precoces que ocorrem na história natural da osteoartrite, difíceis de serem evidenciados na prática clínica.

Apesar de, até o momento, nenhum modelo animal de osteoartrite mimetizar completamente a patogênese observada em humanos, modelos que envolvam o estresse ou a instabilidade parecem representar melhor a agressão traumática crônica envolvida nessa doença.

Dentre esses modelos, pode se citar a utilização de cães (McDEVITT et al, 1976; McDEVITT et al., 1977; KIVIRANTA et al., 1987; KIVIRANTA et al, 1988; JURVELIN et al., 1989; JURVELIN et al., 1990; SAAMANEN et al., 1990; KIVIRANTA et al., 1992; KIVIRANTA et al., 1994; NEWTON et al., 1997; TORZILLI et al., 1997) coelhos (OHTA et al., 1981; LLINAS et al, 1993; ROSA, 1999; BENJAMIN et al., 2002;

BRIAN e ROGER, 2005; KING et al., 2005), cavalos (TODHUNTER et al., 1993; PALMER et al., 1995) e bovinos (MOREL et al., 2004; BASALO et al., 2005; MOREL et al., 2006).

Apesar de se conhecer relativamente bem o metabolismo da cartilagem e do tecido ósseo nesses animais, o tamanho, o custo unitário, o custo de manutenção e a dificuldade no manuseio são fatores que devem ser ponderados na escolha do modelo experimental.

Levando-se em consideração essas premissas, uma possível alternativa é a realização de experimentos *in vitro*, nos quais fragmentos de cartilagem, ou mesmo células cartilaginosas em meio de cultura, são diretamente estimuladas por meios físicos e químicos; obtendo-se em horas as respostas relacionadas ao metabolismo dessas células e tecidos, no próprio meio de cultura (JURVELIN et al., 1990; ATHANASIOU et al., 1991; PALMER et al., 1995; TORZILLI et al., 1997; SAUERLAND et al., 2003; MOREL e QUINN, 2004; BASSALO et al., 2005; MILENTIJEVIC e TORZILLI, 2005; MOREL et al., 2005; MOREL et al., 2006). Apesar de agregarem grande quantidade de conhecimento sobre a fisiologia da cartilagem articular, esse tipo de análise apresenta limitação, já que não mimetiza exatamente o meio e a fisiologia normal de uma articulação e, por essa razão, dificilmente conseguirá substituir a avaliação *in vivo*.

Desse modo, o rato passa a ser uma alternativa adequada, já que esse animal é muito bem estudado do ponto de vista anatômico, metabólico e fisiológico, além de ser facilmente obtido e mantido em laboratório. Apesar dessas vantagens, existem poucos estudos que utilizem esse animal como modelo experimental para o estudo da osteoartrite.

Além disso, existem evidências suficientes na literatura que autorizam a utilização desse animal como modelo experimental, no estudo da cartilagem articular.

Dentre os trabalhos que utilizaram o rato pode-se citar o de CAMARGO FILHO (1998), que avaliou a alteração da espessura e do número de condrócitos no joelho de ratos submetidos a movimentos passivos contínuos, em três amplitudes. O rato era colocado numa máquina de movimentação passiva (com amplitude definida pelo autor como pequena, média e grande), durante uma hora por dia. Observou o autor que no grupo

de maior amplitude houve aumento significativo do número de condrócitos e da medida da espessura da cartilagem. Esse resultado foi interpretado como sendo uma reação adaptativa ao estresse, ou uma condição pré osteoartrítica da cartilagem hialina.

Recentemente RENNERT et al. (2006) estudaram, em ratos, o efeito do estiramento muscular passivo sobre a cartilagem articular do tornozelo, não imobilizada e imobilizada previamente. Concluíram que a imobilização, associada ao estiramento muscular, produziu redução dos proteoglicanos e aumento significativo da celularidade, que foi considerado como sinais precoces de um processo degenerativo ou, pelo menos, de risco para cartilagem articular.

HAYAMI et al. (2006) também utilizaram o rato como modelo experimental para desencadear osteoartrite no joelho pela secção do ligamento cruzado anterior, associada à ressecção do menisco medial. Nessas condições, observaram a redução da espessura da cartilagem, esclerose do osso subcondral e formação de osteofitos, além da perda de proteoglicanos, lesões focais da superfície articular, aumento da proliferação dos condrócitos e redução significativa da espessura da cartilagem após dez semanas de seguimento. Esses achados são os mesmos encontrados em protocolos semelhantes que utilizaram outros animais de experimentação, como o cão, o coelho e o porquinho da índia, reafirmando a validade do rato como animal de experimentação na gênese da osteoartrite.

Diante do exposto, a escolha desse animal, para analisar o efeito do estresse sobre a cartilagem articular, parece estar plenamente justificada.

Outro ponto que merece análise é a escolha da articulação do joelho para o desenvolvimento desse modelo. Essa opção se baseou no fato de que o joelho é a articulação mais utilizada na quase totalidade dos artigos que estudam a gênese da osteoartrite; provavelmente, por se tratar da maior e mais complexa articulação do corpo, situada entre dois grandes braços de alavanca, o que a torna muito suscetível ao estresse e ao trauma (NORDIN e FRANKEL, 1989)

Como fator desencadeante de estresse na cartilagem articular pode-se identificar na literatura os seguintes métodos: produção da instabilidade articular pela secção do ligamento cruzado, associado ou não à menissectomia (MUIR, 1976; McDEVITT et al, 1977; HAYAMI et al., 2006), a corrida estimulada em

esteira rolante (KIVIRANTA et al., 1988; KIVIRANTA et al., 1992; NEWTON et al., 1997; WEAVER e HAUT, 2004), a corrida livre (TODHUNTER et al., 1993), a movimentação passiva controlada (SALTER et al., 1980; KING et al. 2005) e a imobilização (CATERSON e LOWTHER, 1978; OHTA et al, 1981; KIVIRANTA et al. 1987; JUVERLIN et al., 1989; SAAMANEN et al., 1990; KIVIRANTA et al., 1994)

Dentre todos os métodos, o mais fisiológico, constante e mensurável parece ser a corrida, que submete a cartilagem articular a uma situação de movimento e impacto constante.

Estudos recentes com cães têm demonstrado que após correr uma hora, cinco dias por semana, por 15 semanas, havia na zona de contato da cartilagem articular do joelho aumento do conteúdo de condroitina 6 sulfato, assim como da relação entre a condroitina 6 sulfato e a condroitina 4 sulfato. Os chamados fatores de crescimento também participam na manutenção da homeostase da matriz da cartilagem articular e nas suas adaptações metabólicas. Alguns fatores desempenham papel importante na diferenciação dos condrócitos, no crescimento do tecido e nos processos patológicos de reabsorção e reparação (ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE, 14-015). O principal fator do soro que tem esse efeito é o IGF-1, que aumenta a síntese dos proteoglicanos. O TGF-beta aumenta a síntese dos proteoglicanos, do ácido hialurônico e de pequenos proteoglicanos, como o biglican.

O IGF-1 potencializa o efeito catabólico da interleucina 1 e do fator de necrose tumoral sobre os proteoglicanos da cartilagem, enquanto que o TGF-beta se opõe aos efeitos da interleucina 1. O IGF-1 e o TGF-beta podem ser sintetizados na cartilagem articular e outros tecidos da articulação podem secretar esses fatores, como por exemplo, a membrana sinovial inflamada. A ação desses fatores reguladores também podem ser modulados pela secreção de precursores inativos que, por sua vez, são ativados mediante a clivagem da proteína. Alguns desses fatores são, inclusive, mitogênicos e podem interferir no processo de reparação, faltando ainda precisar quais seriam os mecanismos reguladores produzidos pelos polipeptídeos, em condições normais e patológicas (SCULLY et al., 2001).

Estudos *in vitro* também vêm sendo realizados com o intuito de se investigar a reação do colágeno, da matriz e dos condrócitos da cartilagem articular quando submetidos à situações controlado. Em geral, esses trabalhos têm mostrado que solicitações mecânicas elevadas produzem lesões irreversíveis na estrutura do colágeno e redução dos agregados de proteoglicanos (THIBAUT et al., 2002; ACKERMANN e STEINMEYER, 2005; EWERS et al. 2001; CLEMENTS et al., 2004),

Enquanto alguns estudos, particularmente aqueles que analisam atletas que correm longas distâncias, não encontraram associação dessa prática esportiva com a osteoartrite (LANE et al., 1986; KONRADSEN et al. 1990; LANE et al, 1990), outros mais recentes utilizando modelos em animal e em humanos, sinalizam que a sobrecarga articular pode ser um mecanismo desencadeador da osteoartrite (AROKOSKY et al, 1994; SÄÄMÄMEN et al., 1994; LEQUESNE et al., 1997).

A crítica que se coloca na literatura com relação ao uso de modelos animais é que não se tem conseguido obter sinais evidentes do desenvolvimento de osteoartrite, por falta de motivação dos animais e pelo aparecimento da fadiga (KIRIVANTA et al., 1992; AROKOSKY et al, 1993; AROKOSKY et al, 1994).

Por esse motivo, alguns autores lançam mão da secção do ligamento cruzado anterior, associada ou não à ressecção do menisco medial para criar uma situação de instabilidade que, por sua vez altera a resultante das forças que atuam sobre a superfície articular, tanto na magnitude, quanto na área da carga. Essa associação produz mudanças profundas e progressivas na composição bioquímica e nas propriedades mecânicas da cartilagem articular, que resultam em alterações degenerativas em até duas semanas de acordo com MANKIN et al, 2000; HAYAMI et al., 2006). Nessas condições, esses autores observaram redução da espessura da cartilagem, fibrilação, aumento da hidratação, alteração no conteúdo proteoglicanos, redução do número e do tamanho dos agregados de proteoglicanos, espessamento da cápsula articular, esclerose do osso subcondral, formação de osteofitos, lesões focais da superfície articular, aumento da proliferação dos condrócitos e redução significativa da espessura da cartilagem após dez semanas de seguimento.

Apesar do modelo acima citado produzir um quadro clínico e histológico compatível com osteoartrite, inclusive semelhante à encontrada em seres humanos, a produção da instabilidade ligamentar e a retirada do menisco comprometem definitivamente a função e a anatomia da articulação, dificultando o estudo de ações terapêuticas que possam reverter o quadro de osteoartrite.

Por outro lado, modelos que utilizam a imobilização como agente produtor das alterações degenerativas leva à rápida deterioração das propriedades bioquímicas e biomecânicas da cartilagem, resultando em alterações degenerativas, que têm sido, inclusive, utilizadas como modelo para o estudo do processo degenerativo da cartilagem articular. No entanto não são semelhantes àqueles observados na doença degenerativa típica da cartilagem articular (LeROUX et al, 2001; SÄÄMÄNEN, et al. 1990).

HAAPALA et al. (1999), por outro lado, demonstraram que a imobilização causa alterações atróficas na cartilagem articular, com diminuição dos glicosaminoglicanos (GAG), mas com manutenção da rede de colágeno intacta que, no entender dos autores, são insuficientes para iniciar um processo degenerativo verdadeiro na cartilagem articular. Esses autores, inclusive, concluem que as alterações observadas após a imobilização são completamente diferentes daquelas observadas em um processo de osteoartrite precoce. Esses mesmos autores também demonstraram que o retorno às atividades não produziram alterações significativas na espessura da cartilagem, quando comparado com seus controles. Entretanto, KIVIRANTA et al. (1994) demonstraram que a recuperação da espessura não ocorre nas áreas submetidas a menor compressão e que a concentração de proteoglicanos, que estava reduzida em todos os animais após a imobilização, permaneceu entre 14-28% menor do que nos controles, mesmo após 50 semanas de retorno às atividades.

Na busca de outras opções, modelos que utilizem o estresse produzido de forma fisiológica, porém em intensidade exagerada, talvez sejam o melhor caminho para o estudo da história natural da osteoartrite e da eficácia de ações terapêuticas.

Por esse motivo, PAP et al. (1998), utilizaram a auto-estimulação intracraniana para aumentar a motivação e a atividade motora em ratos, que corriam 500 metros (cinco dias por semana), em uma roda de estresse, conseguindo, desse modo, a produção de um modelo de osteoartrite.

Essas considerações acima respaldam a escolha da esteira como indutor de estresse neste estudo, do mesmo modo que a opção pela fase de adaptação como um fator importante para a adequação do rato, tanto do ponto de vista comportamental como fisiológico. A esteira utilizada obrigou o animal a correr 585 metros, em cada sessão de 60 minutos, distância essa semelhante ao estudo mencionado por PAP et al. (1998), que o considerou como de alto impacto para esse animal.

Na avaliação histológica a aparência morfológica da cartilagem, em geral, reflete o seu estado funcional e a sua viabilidade. Para que essa avaliação possa ser feita de forma organizada e padronizada, existem na literatura algumas escalas que quantificam ou pontuam determinados parâmetros morfológicos (O`DRISCOLL et al., 1988; MANKIN et al., 1971; MAINIL-VARLET et al, 2003; RENNER et al, 2006).

Dentre essas escalas, a mais utilizada é a de MANKIN et al (1971), que neste estudo tomada como padrão. O maior problema em relação ao uso dessas escalas é a reprodutibilidade entre as avaliações por diferentes observadores, o que levou a “International Cartilage Repair Society” (ICRS), em “Workshop” realizado em 2002, determinar algumas recomendações para um novo sistema de classificação. Um dos pontos levantados por essa sociedade foi que, em geral, a avaliação feita em humanos é mais difícil, por envolver fragmentos pequenos de cartilagem, diferentemente dos ensaios em animais em que se pode ter toda a articulação para estudo (MAINIL-VARLET et al, 2003).

A análise crítica realizada pelo citado grupo é interessante e merece atenção, podendo os seus critérios também serem utilizados nos estudos de laboratório. Uma das considerações feita pela ICRS é de que quanto mais simples for a análise histológica e quanto mais ela se basear em padrões visuais e menos em padrões verbais, essa avaliação tenderá a ser mais reprodutível (MAINIL-VARLET et al, 2003)

Assim, essa sociedade determinou que fosse utilizado seis critérios para a análise da cartilagem articular, que seriam as análises da superfície, da matrix, da distribuição de células, da viabilidade das células, do osso subcondral e da mineralização da cartilagem.

Neste estudo, foram utilizados quatro dos seis critérios propostos (análise da superfície, da matrix, da distribuição de células e da viabilidade das células), por serem considerados os mais facilmente identificados. Além disso, essas avaliações foram feitas pelo autor e por mais duas pessoas com relativa experiência na análise histológica, todos supervisionados por um patologista.

Dos critérios selecionados, a análise da superfície foi feita de forma global, utilizando-se uma lupa esteotáxica, com excelente qualidade de imagem e que pôde dar uma idéia bastante precisa de toda a superfície da cartilagem articular. Com relação à matrix extracelular, a análise foi feita baseando-se no conteúdo da água, que é um reflexo da rede de colágeno e do conteúdo de proteoglicanos. A avaliação mais detalhada foi realizada em função da distribuição das células e da sua viabilidade, levando-se em consideração a formação de “cluster” e a presença ou não das mitoses.

Neste experimento, os dados obtidos pela análise histológica e pela morfometria indicam que a cartilagem articular dos animais sofreram estresse de alto impacto. O aumento do número e da atividade metabólica dos condrócitos, assim como a desorganização celular e aumento das mitoses, observados de forma mais freqüente nos animais dos grupos experimentais, principalmente após 60 dias, indicam que houve maior produção de glicosaminoglicanos, resultante da agressão que essas células sofreram pelo estímulo mecânico progressivo.

Por outro lado, a redução da espessura da cartilagem articular, observada na mensuração pela microscopia óptica, apesar de sujeita a críticas e a erros, oriundos do posicionamento dos fragmentos durante a realização dos cortes histológicos, foi confirmada pela análise direta realizada com a lupa estereotáxica, que, além disso, mostrou nitidamente, irregularidades do contorno dos côndilos femorais dos ratos do grupo de 60 dias, respaldando, desse modo, os achados da microscopia óptica.

A lesão da rede de colágeno existente na cartilagem articular tem sido colocada como um evento inicial no desenvolvimento da osteoartrite (MANKIN et al., 2000). A ruptura dessa rede traz como conseqüência a alteração da relação água/proteoglicanos existente na matriz cartilaginosa, que pode, inclusive, produzir alterações no

comportamento bioquímico desse tecido (MANKIN et al., 2000). Desse modo, a monitorização da arquitetura e da estrutura molecular da rede de colágeno passa a ser crítica nos estágios precoces da osteoartrite. Dados indiretos da ruptura podem ser aferidos a partir da quantidade de água existente na cartilagem articular. Sabe-se que com a ruptura da rede de colágeno, o processo degenerativo da cartilagem articular evolui de forma irreversível e que, em geral, essa ruptura leva à maior concentração de água por redução da pressão hidrostática no interior do tecido cartilaginoso, que antes era contido pela rede de colágeno (MILENTIZEVIC et al., 2003).

A técnica de espectroscopia por infravermelho, utilizando a transformada de Fourier, é uma ferramenta extremamente eficiente para estudar não só as alterações estruturais da cartilagem no início do processo degenerativo, como também o conteúdo de água e de outras substâncias que possam, eventualmente, ser identificadas pelos raios infravermelho.

As análises da espectroscopia realizadas no presente estudo tiveram o intuito de mensurar o conteúdo de água na cartilagem articular. Os dados obtidos mostram que a perda de massa da cartilagem ocorrida entre 70 e 150°C deve ser interpretada como evaporação quase exclusiva de água livre, dando indícios de que, provavelmente, houve ruptura da rede de colágeno, com ocorrência das conseqüências acima descritas. Embora os dados não tenham sido estatisticamente significativos, talvez devido ao reduzido número de casos, pode-se, em tese, sugerir a seqüência de eventos descrita.

Pode-se concluir, portanto, que os achados histológicos observados na cartilagem articular do joelho, que as alterações da morfologia do côndilo lateral e que a tendência do aumento do conteúdo de água sugerem que o estresse induzido pela esteira rolante, levando os animais a correrem 7,5, 15 e 30 quilômetros durante 15, 30 e 60 dias respectivamente, culminou em um quadro de osteoartrite. A reversibilidade ou não dessa situação clínica poderá ser comprovada por meio de novos estudos de médio e longo prazo, com métodos de análises mais sofisticados, que possam aferir de forma mais precisa, o grau de lesão articular produzida nos animais do grupo experimental.



6- CONCLUSÕES

- 1) Do ponto de vista histológico houve maior desarranjo celular ($p=0,01$), maior número de mitoses ($p=0,02$)
- 2) Houve aumento do número de condrócitos ($p=0,003$) e diminuição da espessura da cartilagem hialina ($p=0,01$) no grupo de 60 dias
- 3) Houve tendência ao aumento do conteúdo da água no grupo de 60 dias ($p=0,09$)

Concluiu-se que a atividade na esteira rolante utilizada durante 60 dias, cinco dias por semana, uma hora por dia com percurso de 585 metros produziu alterações degenerativas na cartilagem hialina do côndilo lateral do joelho do rato em comparação ao grupo controle.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRIGHT, J.A.; BRAND, R.A. The Scientific basis of Orthopaedics. Appleton e Lange, 1987, 2ª. Edição, Connecticut (EUA).
- ACKERMANN, B.; STEINMEYER, J. Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. **Osteoart Cart.** 13 (10): 906-14, 2005.
- ANDREW, R. J. Treadmill for small laboratory animals. **J Appl Physiol**, 20 (3): 572-4, 1965.
- ARMSTRONG, C.G.; MOW, .C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. **J Bone Joint Surg**, 64: 88-94, 1982.
- AROKOSKI, J.; KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; TAMMI, M.; HELMINEN, H.J. Long distance running causes site-dependent decrease of cartilage glycosaminoglycan content in the knee joints of Beagle dogs. **Arthritis Rheum**, 36(10): 1451-59, 1993
- ATHANASIOU, K.A.; ROSENWASSER, M.P.; BUCKWALTER, J.A.; MALININ, T.I.; MOW, V.C. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. **J Orthop Res**, 9:330-40, 1991.
- BALAZS E.A., BLOOM G.A, SWANN D.A. Fine structure and glycosaminoglycan content of the surface layer of articular cartilage. **Fed. Proc.** 25 (6): 1813-6, 1966.
- BASSALO, I.M.; RAJ, D.; KRISHNAN, R.; CHEN, F.H.; HUNG, C.T.; ATESHIAN, G.A.: Effects of enzymatic degradation on the frictional response of articular cartilage in stress relaxation. **J Biomechanics**, 38: 1343-9, 2005.
- BEHRENS, F., KRAFT, E., OEGEMA JR, T. R. Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. **J Orthop Res**, 7(3): 335-43, 1989.
- BI, X.; LI, G.; DOTY, S.B.; CAMACHO, N.P. A novel method of determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS). **Osteoarthr Cart**, 13: 1050-8, 2005.
- BOLLET, A.J.; NANCE, J.L. Biochemical findings in normal and osteoarthritic articular cartilage II condroitin sulfate concentration and chain length, water and ash content. **J. Clin. Invest.** 45 (7): 1170-1177, 1966.
- BULLOUGH, P.G.; JAGANNATH, A. The morphology of the calcification front in articular cartilage. **J Bone Joint Surg**, 65B: 72, 1983.

CAMARGO FILHO, J. C. S.; VANDERLEI L. C. M; MAZZER, N.; PERINI, M.; SANTANA, T. Análise das alterações Histológicas da Cartilagem Articular de Joelhos de Ratos Induzidas por Exercícios Contínuos na Água. Anais do IV Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde, p xx, 1998, Curitiba, *Anais...Curitiba -Pr* : Sociedade Brasileira de Informática em Saúde.

CAMARGO FILHO, J. C. S.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H. Alterações provocadas por esforços repetitivos na cartilagem articular do joelho-estudo realizado em ratos. XXXI Congresso Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia, p. 83, 1998, Goiânia -Go. *Anais...Goiânia - Go*: Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia.

CAMARGO FILHO, J. C. S.; VANDERLEI, L. C. M.; CAMARGO, R. C. T. Mecanismos adaptativos da cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos a estresse por natação. Anais da XIV Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, p 14, 1999, Caxambu, *Anais... Caxambu*: FESBE, 1999, p. 263.

CARTER, D. R. Rabbit Knee immobilization: Bone remodeling precedes cartilage degradation. **J Orthop Res**, 10: 88-95, 1992.

CATERSON, B.; LOWTHER, D. A. Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. **Acta Bioch Bioph**, 540: 412-22, 1978.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. 2^a ed. Rio Grande do Sul: Artes Médicas, 1996.

CHATAM, W. W.; SWAIM, R.; FROHSIN, H.; HECK, L.W.; MILLER, E.J.; BLACKBURN, W.D. Degradation of human articular cartilage by neutrophils on synovial fluid. **Arthr. and Rheum**, 36(1):51-8, 1993.

CHEN, C.T.; BHARGAVA, M.; LIN, P.,M.; TORZILLI, P.A. Time, stress, and location dependent chondrocyte death and collagen damage in cyclically loaded articular cartilage. **J Orthop Res**, 21: 888-98, 2003.

D`LIMA, D.D.; HASHIMOTO, S.; CHEN, P.C.; COLWELL, C.W.; LOTZ, M.K.. Impact of mechanical trauma on matrix and cells. **Clin Orthop Rel Res**, 391: 90-99, 2001.

DAVIS, W.; MOSKOWITZ, R. W. Degenerative joint changes following posterior cruciate ligament section in the rabbit. **Clin. Orthop Rel Res**, 93: 307-12, 1973.

Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Aparato Locomotor (14-015), Elsevier, França, p. 1-17.

EWERS, B.J.; WEAVER, B.T.; SEVENSMA, E.R.; HAUT, R.C. Chronic changes in rabbit retro-patellar cartilage and subchondral bone after blunt impact loading of the patellofemoral joint. **J Orthop Res**, 20: 545-50, 2002.

FERRY, J.D. Viscoelastic properties of polymers, Wiley, 1970, New York.

GARCIA-MARQUEZ, C.G.; ARMARIO, A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. **Physiol Behav**, 40: 33– 8, 1987.

GARG, H.G.; SWANN, D.A Age-related changes in the chemical composition of bovine articular cartilage. **Biochem.** , 193: 459, 1981.

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

HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; GREGG, Y.A.; WESOLOWSKI, G.A.; RODAN, G.A.; DONG, L.T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transaction and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, 38: 234-43, 2006.

HAYES, W.C.; BODINE,A.J. Flow independent viscoelastic properties of articular cartilage matrix. **J Biomech**, 11:407, 1978.

HOMANDBERG, G.E. Cartilage damage by matrix degradation products: fibronectin fragments. **Clin Orthop Rel Res**, 391S: S-100-S107, 2001.

JACKSON, D.W.; SIMON, T.M.; ABERMAN, H.M. The articular cartilage repair dilemma **Clin Orthop Rel Res**, 391-S: 14-25, 2001.

JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I.; SÄÄMÄNEN, A.M.; TAMMI, M.; HELMINEN,H.J.: Indentation stiffness of young canine knee articular cartilage – influence of strenuous joint loading. **J Biomechanics**, 23(12): 1239-46, 1990.

JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I.; SAAMANEN, M.; TAMMI, M.; HELMINEN, H.J. Partial restoration of immobilization-induced softening of canine articular cartilage after remobilization of the knee (stifle) joint **J Orthop Res**, 7: 352-8, 1989.

- KEMPSON, G. E. Age-related changes in the tensile properties of human articular cartilage: a comparative study between the femoral head of the hip joint and the talus of the ankle joint. **Acta Bioch Bioph**, 1975: 223-30, 1991.
- KING, K.B.; OPEL, C.F.; REMPEL, D.M. Cyclical articular joint loading leads to cartilage thinning and osteopontin production in a novel in vivo rabbit model of repetitive finger flexion. **Osteoarthritis and Cartilage**, 13: 971-8, 2005.
- KIVIRANTA, I TAMMI, M.; JURVELIN, J.; SAAMANEN, A.M.; HELMIENEN, H. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. **J Orthop Res**, 6: 188-95, 1988.
- KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; AROKOSKI, J.; SÄÄMÄNEN, A.M.; HELMINE, H.J. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the young canine knee joint after remobilization of the immobilized limb. **J Orthop Res**, 12: 161-7, 1994.
- KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; AROKOSKI, J.; SAAMANEN, A.M.; HELMINEN, H.J.; Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the canine knee joint after strenuous running exercise. **Clin Orthop**, 302-308, 1992.
- KIVIRANTA, I; JURVELIN, J.; TAMMI, M.; SAAMANE, A.M.; HELMINEN, H.J. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young Beagle dogs. **Arthritis Rheumatism**, 30 (7): 801-9, 1987.
- KONRADSEN, L.; HANSEN, E.M.; SONDERGAARD, L. Long distance running and osteoarthrosis **Am J Sports Med**, 18 (4): 379-81, 1990.
- LAKES, R.; SAHA, S. Cement line motion in bone **Science**, 204: 501, 1979.
- LeROUX, M.A.; CHEUNG, H.S.; BAU, J.L.; WNAG, J.Y, HOWELL, D.S; SETTON, L.A. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis Cartilage**, 19: 633-40, 2001.
- LANE, N.E.; BLOCH, D.A.; JONES, H.H.; MARSHALL, W.H.; WOOD, P.D.; FRIES, J.F. Long distance running, bone density, and osteoarthritis **J Amer Med Assoc**. 25 (9): 1986.
- LIPSHITZ, H.; ETHEREDGE, R.; GLIMCHER, M.J Changes in the hexosamine content and selling ratio of articular cartilage as functions of depth from the surface **J Bone Joint Surg**, 58A: 1149, 1976.

LLINAS, A.; McKELLOP, H.A.; MARSHALL, G.J.; SHARPE, F.; LU, B.; KIRCHEN, M.; SARMIENTO, A. Healing and remodeling of articular incongruities in a rabbit fracture model. **J Bone J Surg**, 75-a(10): 1508-23, 1993

LOHMANDER, L.S. What can we do about osteoarthritis? **Arthritis Res**, 1:95-100, 2000.

LOTZ, M. Cytokines in cartilage injury and repair. **Clin Orthop Rel Res**, 391: 108-115, 2001.

LOVÁSZ, G.; LLINÁS; A.; BENYA, P.; BODEY, B.; MCKELLOP, H.A.; LUCK JR, J.V.; SARMIENTO, A. Effects of valgus tibial angulation on cartilage degeneration in the rabbit knee **J Orthop. Res**, 13: 846-53, 1995.

MAINIL-VARLET, P.; AIGNER, T.; BRITTBURG, M.; BULLOUGH, P.; HOLLANDER, A.; HUNZIKER, E. et al. Histological assessment of cartilage repair. **J Bone Joint Surg**, 85(A); 45-57, 2003.

MANKIN, H.A.; THRASHER, A.Z. Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. **J Bone Joint Surg.**, 57(A): 76, 1975

MANKIN, H.J. Effect of systemic corticosteroids on rabbit articular cartilage. **Arthritis Rheum**, 15: 593, 1972.In:

MANKIN, H.J.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A.: Biomechanical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **J Bone J Surg**, (AM), 53: 523-37, 1971.

MANKIN, H; MOW, V.C.; BUCKWALTER, J.A.; IANNOTTI, J.P.; RATCLIFFE, A. Articular cartilage structure, composition and function. In: Buckwalter, J.A.; Einhorn, T.A.; Simon, S. R., Orthopaedic Basic Science. Biology and biomechanics of the musculoskeletal system, 2a. edição, American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2000, Boston (EUA), p. 443-470.

MARCONDES, F.K; VANDERLEI, L.C.M.; LANZA, L.L.B.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can J Physiol Pharmacol**, 74: 663-69, 1996.

MAROUDAS A.; EVANS, H.; ALMEIDA, L. Cartilage of the hip joint. Topographical variation of glycosaminoglycan content in normal and fibrillated tissue **Ann Rheum Dis**, 32 (1): 1-9, 1973.

- McDEVITT, C., MUIR, H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. **J Bone Joint Surg**, 58-B (1): 94-101, 1976.
- McDEVITT, C., GILBERTSON, E.; MUIR, H. An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes **J Bone Joint Surg**, 59(B): 24-35, 1977.
- MILENTIJEVIC, D.; TORZILLI, P.A. Influence of stress rate on water loss, matrix deformation and chondrocyte viability in impacted articular cartilage **J Biomechanics**, 38: 493-502, 2005.
- MOREL, V.; BERUTTO, C.; QUINN, T.M.: Effects of damage in the articular surface on the cartilage response to injurious compression in vitro. **J Biomechanics**, 39: 924-30, 2006.
- MOREL, V.; MERÇAY, A.; QUINN, TM. Prestrain decreases cartilage susceptibility to injury by ramp compression in vitro. **Osteoarthritis and Cartilage**, 13: 964-70, 2005.
- MOREL, V.; QUINN, T.M.: Cartilage injury by ramp compression near the gel diffusion rate. **J Orthop Res**, 22: 145-51, 2004.
- MOW, V.C., HOLMES, M.H., LAI, W.M. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. **J Biomechanics**, 17: 377-394, 1984.
- MOW, V.C.; PROCTOR, C.S.; KELLY, M.A. Biomechanics of articular cartilage. In: NORDIN, M.; FRANKEL, V.H. Biomechanics of the knee. In: Nordin, M. e Frankel, V.H. Basic biomechanics of the musculoskeletal system. 2a. edição, Filadelfia (Londres), Editora Lea & Febiger, 1989, p. 31-57.
- MUIR, H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. **Biochem Soc. Trans**, 11: (6): 613-22, 1983.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. Harper: bioquímica. 7ª ed. São Paulo: Atheneu, 1994.
- NEWTON, P.M.; MOW, V.C.; GARDNER, T.R.; BUCKWALTER, J.A.: The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. **J Sports Medicine**, 25(3): 282-7, 1997
- NORDIN, M.; FRANKEL, V.H. Biomechanics of the knee. In: Nordin, M. e Frankel, V.H. Basic biomechanics of the musculoskeletal system. 2a. edição, Filadelfia (Londres), Editora Lea & Febiger, 1989, p. 115-134.
- O'DRISCOLL, S.W.; KEELEY, F.W.; SALTER, R.B. Durability of regenerated articular cartilage produce by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in

joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. **J Bone Joint Surg (AM)**, 70: 595-606, 1988.

OHTA, N.; KAWAI, N.; KAWAJI, W.; HIRANO, H. Morphological changes in rabbits articular cartilage experimentally induced by joint contracture in association with aging. **Okajimas Folia Anat**, 58(3): 205-20, 1981.

OSTMAN-SMITH, I. Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercises or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. **Acta Physiol Scand**, suppl 47: 1-118, 1979.

PALMER J.L., BERTONE, A.L.; MALEMUD, C.J.; CARTER, B.G.; PAPAY, R.S.; MANSOUR, R.J. Site specific biochemical characteristics of third carpal articular cartilage in exercised versus nonexercised horses. **Am J Vet Res**, 56(2): 1570-6, 1995. a

PALMER, J.L.; BERTONE, A.L.; MANSOUR, J.; CARTER, B.G.; MALEMUD, C.J. Biomechanical properties of third carpal articular cartilage in exercised and nonexercised horses. **J Orthop Res**, 13: 854-60, 1995. b

PALMOSKI, M. J. Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal articular cartilage. **Arthritis Rheum**, 23(3): 325, 1980.

PAP, G.; EBERHARDT, R.; STÜRMER, I.; MACHNER, A.; SCHWARZBERG, H.; ROESSNER, A. ; NEUMANN, W. Development of osteoarthritis in the knee joints of wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. **Pathol Res Pract**, 194: 41-7, 1998.

PATWARI, P.; FAY, J.; COOK, M.N.; BADGER, A.; KERIN, A.J.; LARK, M.W.; GRODZINSKY, A.J.: In vitro models for investigation of the effects of acute mechanical injury on cartilage. **Clin Orthop Rel Res**, 391S: S61-S71, 2001.

QI, W.; SCULLY, S.P. Type II collagen modulates the composition of extracellular matrix synthesized by articular chondrocytes., 2001. .

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

ROUGHLEY, P.J.; WHITE, R.J. Age related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. **J Biol Chem**, 255:217, 1980.

- SAAMANEN, A.M.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I.; HELMINE, H.J.: Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in articular cartilage of young canine knee (Stifle) joint. **J Orthop Res**, 8: 863-73, 1990.
- SALTER, B. R. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular Cartilage. **J. Bone Joint Surg**, 62(8): 1232-51, 1980.
- SAUERLAND, K.; RAISS, R.X.; STEINMEYER, J.: Proteoglycan metabolism and viability of articular cartilage explants as modulated by the frequency of intermittent loading. **Osteoarthritis and Cartilage**, 11:343-50, 2003.
- SCULLY et al., 2001
- SHAPIRO, F. D.; GLIMCHER, M. J. Induction of osteoarthrosis in the rabbit knee joint: histologic changes following meniscectomy and meniscal lesion. **Clin. Orthop**, 147: 287-95, 1980.
- SILVA, O. L., PIVA, N., FONSECA, J. C. P. Articular cartilage changes mechanically induced "in vivo". An experimental method approach in animals. **Rev Bras de Pesquisas Médicas e Biológicas**, 11: 277-81, 1978.
- SIMUNEK, A.; MUIR, H. Changes in the proetin-polysaccharides of pig articular cartilage during prenatal life, development and old age. **Biochim J.**, 126: 515, 1972.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios de análise instrumental. 5ª. Edição, Editora Bookman, ano, 2002, p. 342-362 e 363-384.
- STOCKWELL, R.A. **Biology of cartilage cells**. Cambridge University Press, 1979.
- SWEET, M.B.E.; THONAR, E.J.M.A; MARSH, J. Age related changes in proeoglycan structure. **Arc Bichem Biophys**, 198: 439, 1979
- THAXTER, T. H.; MANN, R. A.; ANDERSON, C. E. Degeneration of knee joints in rats. **J. Bone Joint Surg**, 47: 567-85, 1965.
- THIBAUT, M.; POOLE, A.R.; BUSCHMANN, M.D. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments **J Orthop Res**, 28 (6): 1265-73, 2002.

- TODHUNTER, R. J.; MINOR, R.R.; WOOTTON, J.A.M.; KROOK, L.; BURTON-WURSTER, N. Effects of exercise and polysulfated glycosaminoglycan on repair of articular cartilage defects in the equine carpus. **J Orthop Res**, 11: 782-95, 1993.
- TORZILINI, P. A.; GRIGIENE, R.; HUANG, C.; FRIEDMAN, S.M.; DOTY, S.B.; BOSKEY, A.L.; LUST, G.: Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system. **J Biomechanics**, 30(1): 1-9, 1997.
- TORZILLI, P.A.; MOW, V.C. On the fundamental fluid transport mechanisms through normal and pathological articular cartilage during function. I The formulation. **J Biomech**, 9: 541: 572, 1976.
- VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STUSSI, E.: The effect of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis and Cartilage**, 10: 408-19, 2002.
- VISSER, N. A.; KONING, M.H.; LAMMI, M.J.; HAKKINEN, T. Increase of decorin content in articular cartilage following running. *Connect. Tissue Res*, 37 (3-4): 295-302, 1998
- WALKER, J. M. Pathomechanics and classification of cartilage lesions, facilitation of repair. **J. Orthop Sports Phys Ther**, 28(4), p. 216-31, 1998.
- WEAVER, B.; HAUT, R.C. Enforced exercise after blunt trauma significantly affects biomechanical and histological changes in rabbit retro-patellar cartilage. **J Biomechanics**, 38: 1177-83, 2005.
- WEISS, C.; ROSENBERG, L.; HELFET, A.J. An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. **J Bone Joint Surg.**, 50-A: 663, 1968.
- WOO, S.L.Y.; AKESON, W.H.; JEMMOTT, G.F. Measurements of nonhomogeneous directional mechanical properties of articular cartilage in tension. **J Biomech**, 9: 785, 1976.
- WOO, S.L.Y.; GOMEZ, M.A.; AKESON, W.H. The time and history dependent viscoelastic properties of the canine medial collateral ligament. **J. Biomech. Eng.**, 103: 293, 1981.
- YAN, G., KERONG, D. Degenerative Mechanism of articular Cartilage Induced by low stress. A morphological study. **Chinese Med J**, 108: (11): 835-8, 1995.