

# ASPECTOS CLÍNICOS E MORFOFISIOLÓGICOS DO JOELHO DE RATOS APÓS IMOBILIZAÇÃO PROLONGADA E REMOBILIZAÇÃO.

Maise Rezende Galvão<sup>1</sup>  
Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>1</sup>  
Marlene Isabel Vargas Vilorio<sup>1</sup>  
Antonio José Natali<sup>2</sup>  
Anna Laetícia Barbosa<sup>1</sup>  
Betania de Souza Monteiro<sup>1</sup>  
Lisandra Cristina Perez Pinheiro<sup>1</sup>  
Karolina Nadur Del Carlo<sup>3</sup>

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos clínicos e morfofisiológicos da articulação do joelho de ratos após imobilização prolongada e remobilização com atividade livre e natação. Trinta e quatro ratos adultos machos (Wistar) foram alocados aleatoriamente em quatro grupos: sem imobilização, grupo de controle (G1,  $n = 4$ ); com imobilização (G2,  $n = 10$ ); com imobilização e remobilização com atividade livre (G3,  $n = 10$ ); com imobilização e remobilização com atividade livre e natação (G4,  $n = 10$ ). Os animais tiveram o joelho direito imobilizado por 45 dias. Os ratos do G2 foram eutanasiados após o período de imobilização, juntamente com os do G1. Após o período de imobilização, os animais do G3 movimentaram-se livremente em suas respectivas gaiolas e os do G4, além da movimentação na gaiola, foram submetidos a um programa de natação por 5 semanas, sendo todos eutanasiados em seguida. Durante o período de remobilização, o G3 e o G4 foram submetidos à avaliação clínica da marcha. Após o sacrifício, a resistência à flexão articular do joelho direito de todos os animais foi avaliada e cortes histológicos da cápsula articular, da cartilagem e do osso subcondral foram feitos. Os resultados mostraram que os animais do G4 apresentaram melhor evolução na marcha, nos cinco primeiros dias, em relação àqueles do G3. Após este período, a evolução na marcha foi similar em G3 e G4. Os animais do G2 apresentaram rigidez articular, enquanto os de G3 e G4 mantiveram o movimento próximo ao normal. A análise histológica mostrou que a imobilização promoveu aumento da espessura da cápsula articular, evidenciada pela presença do tecido conjuntivo fibroso substituindo o tecido adiposo no G2, mas em menor proporção em G3 e G4. Pela análise da cartilagem articular e do osso subcondral, pode-se observar que a imobilização determinou perda de proteoglicanos da matriz cartilaginosa, aumento do número de condrocitos, que ficaram dispostos de forma irregular, aumento da espessura da cartilagem calcificada, irregularidade da superfície articular, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e aumento da espessura do osso subcondral. Os animais do G3 apresentaram maior número de alterações tanto na cartilagem articular como no osso subcondral, quando comparados com os do G4. A imobilização degenerou as células sinoviais, indicando diminuição da produção de fluido sinovial e redução do suprimento nutricional à cartilagem. Tanto a atividade livre na gaiola quanto sua associação com a natação influenciaram positivamente o retorno das condições morfológicas da cápsula.

Palavras-chave: imobilização articular, remobilização articular, rigidez articular.

<sup>1</sup> Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: ricarlo@ufv.br

<sup>2</sup> Departamento de Educação Física UFV. E-mail: anatali@ufv.br

<sup>3</sup> Médica autônoma.

**ABSTRACT****CLINICAL AND MORPHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE RAT KNEE JOINT AFTER IMMOBILIZATION AND REMOBILIZATION**

The aim of this study was to evaluate the clinical and morphophysiological aspects of the rat knee joint after immobilization and remobilization with free activity and swimming. Thirty four adult male rats (Wistar) were randomly allocated into one of four groups: without immobilization, control group (G1,  $n = 4$ ); with immobilization (G2,  $n = 10$ ); with immobilization and remobilization with free activity (G3,  $n = 10$ ); and with immobilization and remobilization with free activity and swimming (G4,  $n = 10$ ). Animals had the right knee joint immobilized for 45 days. Animals from G1 and G2 were euthanized after this immobilization period. Animals from G3 were allowed to move freely in their cages after the immobilization period, and those from G4 were submitted to a swimming program for 5 weeks and were then euthanized. During the remobilization period, animals from G3 and G4 had their march clinically evaluated. After being euthanized, the articular amplitude of the right knee was assessed in all animals and histological slices from the articular capsule, cartilage and subchondral bone were prepared. The results showed that animals from G4 exhibited a better march evolution on the first five days compared to those from G3. After this period, march evolution were similar in both G3 and G4. Animals from G2 displayed a rigid joint while in those from G3 and G4 the articular movement was close to normal. The histological analysis pointed out that immobilization led to an increase in articular capsule thickness, evidenced by the presence of fibrous connective tissue replacing adipose tissue in G2, but proportionally less in G3 and G4. Analysis of the articular cartilage and subchondral bone indicated that immobilization determined loss of proteoglycans from the cartilaginous matrix, an increase in the number of regularly arranged chondrocytes, an increase in calcified cartilage thickness, irregularity in the articular surface, proliferation of connective tissue in the intra-articular space and an increase in subchondral bone thickness. Animals from G3 displayed a greater number of alterations in both the articular cartilage and the subchondral bone, as compared to those from G4. Synovial cells were degenerated by immobilization, indicating decreased synovial fluid production and reduced nutritional supply to the cartilage, and both free cage activity and its association with swimming influenced positively the return of the capsule morphological conditions.

Key words: articular immobilization, articular remobilization, articular flexibility

**INTRODUÇÃO**

Quando a articulação do joelho é imobilizada por um período prolongado, as mudanças degenerativas na cartilagem podem ser ocasionadas por pressão local ou ausência dela e se assemelham às produzidas nas doenças articulares degenerativas (Troyer, 1975). Especificamente, a pressão hidrostática intermitente é responsável pela manutenção da cartilagem. Já a pressão, a fricção e a carga estática prolongada ou ausência dela determinam destruição e ossificação da cartilagem (Vanwanseele *et al.*, 2002).

A cartilagem articular requer algum regime de carga e movimento para manter sua natureza física e propriedades bioquímicas. Modelos experimentais, *in vivo*, de redução de carga articular e imobilização do membro induzem à degeneração articular, incluindo redução da hidratação, alteração da estrutura e redução da síntese de proteoglicanos. A diminuição da espessura da cartilagem articular, observada em alguns locais, pode refletir na diminuição da capacidade de absorção de car-

gas. Algumas dessas alterações são, ao menos parcialmente, reversíveis para valores normais após a remobilização da articulação (Leroux *et al.*, 2001; Narmoneva *et al.*, 2002).

A imobilização prolongada de uma articulação sinovial resulta em perda de macromoléculas estruturais da matriz, porém, se a imobilização for interrompida, os condrócitos voltam a sintetizar as macromoléculas com suficiente rapidez e, a cartilagem poderá ser sintetizada com êxito, tornando as alterações reversíveis. Em caso contrário, a lesão poderá ser permanente e irreversível (Brandt, 2003).

As mudanças induzidas pela falta de carga na articulação de cães são reversíveis tanto na matriz da cartilagem calcificada quanto na não-calcificada, mas a completa restauração da concentração de glicosaminoglicanos de forma uniforme, após 50 semanas, sugere que é necessário um longo período de remobilização (Haapala *et al.*, 1999).

Estudos *in vitro* (Palmoski, 1981) mostraram que força compressiva estática resulta em redução reversível do nível de síntese de proteoglicanos na cartilagem articular humana normal, enquanto cargas cíclicas, como ocorre na deambulação, estimulam a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar clínica e morfofisiologicamente os efeitos da imobilização articular e da remobilização sobre o joelho de ratos, pois o conhecimento destas alterações é essencial para a otimização de programas de reabilitação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 34 ratos adultos machos (*Ratus Norvegicus* – Wistar), com peso corporal entre 150 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: 1) sem imobilização, grupo de controle (G1,  $n = 4$ ); 2) com imobilização, grupo de controle para a evolução dos tratamentos (G2,  $n = 10$ ); 3) com imobilização e remobilização com atividade livre (G3,  $n = 10$ ); e 4) com imobilização e remobilização com atividade livre e natação (G4,  $n = 10$ ). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (dois por gaiola), mantidos em ambiente com temperatura média de 24°C e fotoperíodo de 12 horas, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais do grupo 1 foram mantidos em atividade livre por 45 dias. Já os constituintes dos grupos 2, 3 e 4 foram anestesiados por inalação de éter etílico em câmara de gás, mantidos em circuito anestésico aberto, com a articulação femorotíbiopatelar direita imobilizada com atadura gessada, em extensão, por 45 dias. O gesso foi colocado mantendo também a articulação coxofemoral em extensão e abdução de 45°. Para manter fixa a imobilização, o gesso foi colocado ao redor das regiões pélvica e abdominal, e a articulação tibiotársica foi mantida livre. O aparelho gessado foi substituído imediatamente, quando necessário, e não impedia o deslocamento dos animais nas gaiolas.

Os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica (éter anestésico) em câmara de gás: G1 após 45 dias de observação, G2 logo após a retirada do gesso, e G3 e G4 no final do período de exercício, ou seja, após 5 semanas.

Os animais do G3, após a retirada do gesso, foram alojados em gaiolas apropriadas, movimentando-se livremente durante cinco semanas. Os animais do G4, após a retirada do gesso, também foram alojados em gaiolas, com movimentação livre e, adicionalmente, foram submetidos a um programa progressivo de natação, cinco vezes por semana, durante cinco semanas, de acordo com

o seguinte protocolo: na primeira semana, para adaptação, os animais nadaram por 5 minutos, acrescentando-se 5 minutos a partir do segundo dia. Assim, no final da primeira semana os animais estavam nadando 25 minutos. Na segunda semana, iniciaram com 30 minutos de natação chegando aos 50 minutos. Na terceira semana, iniciaram com 55 minutos de natação e no segundo dia, atingiram 60 minutos. A partir daí, a sessão de natação teve duração diária de 60 minutos até a quinta semana.

A natação foi realizada em um tanque com as seguintes dimensões: 80cm X 65cm X 45cm (profundidade, largura e comprimento), com água aquecida e mantida entre 32 e 35°C para amenizar o estresse dos animais. O nível da água inicialmente foi de 19cm para que os animais pudessem colocar o membro posterior esquerdo no fundo do tanque, permitindo uma adaptação do animal ao meio. A partir do segundo dia, o nível foi aumentado para 30cm, permitindo somente a natação livre.

Para a avaliação clínica da marcha, após a retirada da imobilização, os animais do G3 e G4 foram observados em suas respectivas gaiolas cinco dias por semana, durante cinco semanas, num total de 25 parcelas de tempo. A evolução da marcha foi classificada com notas de 1 a 5, de acordo com os seguintes critérios: 1- marcha sem apoio; 2- marcha com apoio do membro, mantendo-o em extensão e abdução; 3- marcha com apoio do membro, mantendo-o em extensão; 4- marcha com apoio do membro, mantendo-o em abdução; 5- marcha normal.

Para a avaliação da efetividade da remobilização, após o eutanasia dos animais do G2, G3 e G4, analisou-se o grau de movimentação da articulação do joelho em comparação com a movimentação da articulação contralateral, determinando, dessa forma, a resistência à flexão articular, de acordo com Evans *et al.* (1960).

Para a análise histológica, foram coletadas a cápsula articular da articulação femorotíbiopatelar e as epífises distal do fêmur e proximal da tíbia direita de todos os animais, que foram comparadas com as mesmas estruturas coletadas e processadas de G1.

As cápsulas articulares foram isoladas após a dissecação dos ligamentos patelar e colaterais e a liberação da patela. Em seguida, foram fixadas em formol neutro a 10% tamponado, por aproximadamente 24 horas. Após a fixação, as cápsulas foram processadas rotineiramente pela técnica de inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 6µm de espessura na cápsula articular e corados com hematoxilina & eosina (HE). Foram examinados ao microscópio óptico, objetivando analisar a proliferação de tecido conjuntivo subsinovial intracapsular, presença de vilos e proliferação celular.

Os fragmentos osteocondrais coletados foram fixados em formol neutro a 10% tamponado por aproxi-

madamente 48 horas. Após a fixação, os fragmentos foram descalcificados em ácido fórmico a 10%, tamponado com citrato de sódio (pH 4,5), sob vácuo moderado. Após a descalcificação, esses fragmentos foram seccionados longitudinalmente e, então, processados pela técnica de inclusão em parafina. Os cortes de 6µm de espessura foram corados com HE e azul de toluidina e examinados ao microscópio óptico, objetivando analisar alterações celulares e da matriz cartilaginosa, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e irregularidade da superfície articular. No osso subcondral foram avaliados a espessura e aspecto das trabéculas.

Para análise estatística, os dados da avaliação das marchas dos grupos atividade livre (G3) e atividade livre + natação (G4) foram submetidos aos testes de aná-

lise de variância (ANOVA) e teste F. Os dados foram, em seguida, submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade com resíduo combinado (Erro A + Erro B) e grau de liberdade combinado, para analisar o comportamento das médias das marchas ao longo do tempo. Os achados macroscópicos e histológicos foram submetidos à análise descritiva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da avaliação da marcha dos grupos de atividade livre (G3) e atividade livre associada à natação (G4), como dois tratamentos distintos, submetidos aos testes estatísticos estão apresentados nas

**Tabela 1** - Demonstrativo da análise de variância da marcha dos grupos G3 e G4, após 45 dias de imobilização e 5 semanas de remobilização da articulação do joelho

Fator de Variância	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	1	0,20	0,20	0,01	ns
Erro A	18	184,76	10,24		
Tempo	24	452,30	18,84	49,27	s
Interação	24	14,30	0,59	1,55	s
Erro B	432	165,24	0,38		
TOTAL	499	816,80			
Média				4,08	
Coeficiente de variação parcela				78,52	
Coeficiente de variação subparcela				15,15	

De acordo com a Tabela 1, não houve diferença significativa entre os tratamentos, a 5% de probabilidade pelo teste F, porém, o fator tempo e a interação

tratamento “vs” tempo foram significativos no mesmo nível de significância.

**Tabela 2** - Médias dos escores atribuídos à marcha de ratos submetidos à imobilização da articulação femorotibiopatelar por 45 dias seguida de remobilização com atividade livre (G3) e atividade livre associada a natação (G4)

Observações	Grupo 3	Grupo 4
1	1,3 B	1,9 A
2	1,7 B	2,4 A
3	2,2 A	2,4 A
4	2,1 B	3,1 A
5	3,1 A	3,1 A
6	3,9 A	4,0 A
7	4,2 A	4,0 A
8	4,3 A	4,0 A
9	4,3 A	4,2 A
10	4,3 A	3,8 A
11	4,4 A	4,1 A
12	4,5 A	4,1 A
13	4,5 A	4,3 A
14	4,4 A	4,3 A

continua...

continuação...

Observações	Grupo 3	Grupo 4
15	4,4 A	4,7 A
16	4,4 A	4,7 A
17	4,7 A	4,6 A
18	4,7 A	4,6 A
19	4,7 A	4,6 A
20	4,7 A	4,6 A
21	4,7 A	5,0 A
22	5,0 A	5,0 A
23	5,0 A	5,0 A
24	5,0 A	5,0 A
25	5,0 A	5,0 A

Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A avaliação da marcha do G4 demonstra significativa melhora nos cinco primeiros dias, em relação ao G3 (Tabela 2). Após esse período, há tendência de os grupos apresentarem a mesma evolução em relação ao tempo. A melhora nos cinco primeiros dias da marcha do G4 pode estar relacionada aos efeitos fisiológicos do calor pelo processo de condução, passando da água aquecida para os tecidos, determinando alívio da dor ou aumento do seu limiar, relaxamento muscular, aumento do fluxo sanguíneo e redução da rigidez articular providos pelo aumento da extensibilidade do colágeno, também observado por Collins (1998). Pode também estar relacionada às atividades realizadas dentro da água, que motivaram aumento da amplitude articular, fortalecimento dos músculos enfraquecidos e aumento de sua tolerância ao exercício, bem como redução de edemas pela ação da pressão hidrostática, conforme observado por Campion (2000).

Outro fator relacionado é a flutuabilidade, que pode ser explicada pelo princípio de Arquimedes: quando um corpo é submerso em um líquido, ele sofre uma força de flutuabilidade igual ao peso do líquido que desloca, sendo a densidade relativa da água aceita como uma proporção de 1; qualquer objeto com uma densidade menor que 1 irá flutuar (Campion, 2000). Por essa razão, ocorreu alívio do estresse sobre as articulações em estudo, permitindo a realização de movimentos em forças gravitacionais reduzidas. Pode-se inferir que a natação em piscina aquecida determina melhora mais rápida da marcha, ou seja, o apoio do membro comprometido mais precocemente, melhorando a qualidade de vida dos animais.

Na avaliação da resistência à flexão articular, mediante mensuração direta do grau de movimentação após 45 dias de imobilização, observou-se, nos animais do G2, rigidez articular e atrofia da musculatura, enquanto os animais do G3 e G4 após as cinco semanas de remobilização (35 dias), já estavam quase normais. Com a imobilização, ocorreu ausência de movimento e, conseqüentemente, da contração muscular, ocasionando diminuição do fluxo sanguíneo, edema e hipóxia, que determinaram a hipotrofia muscular (Salter, 1985).

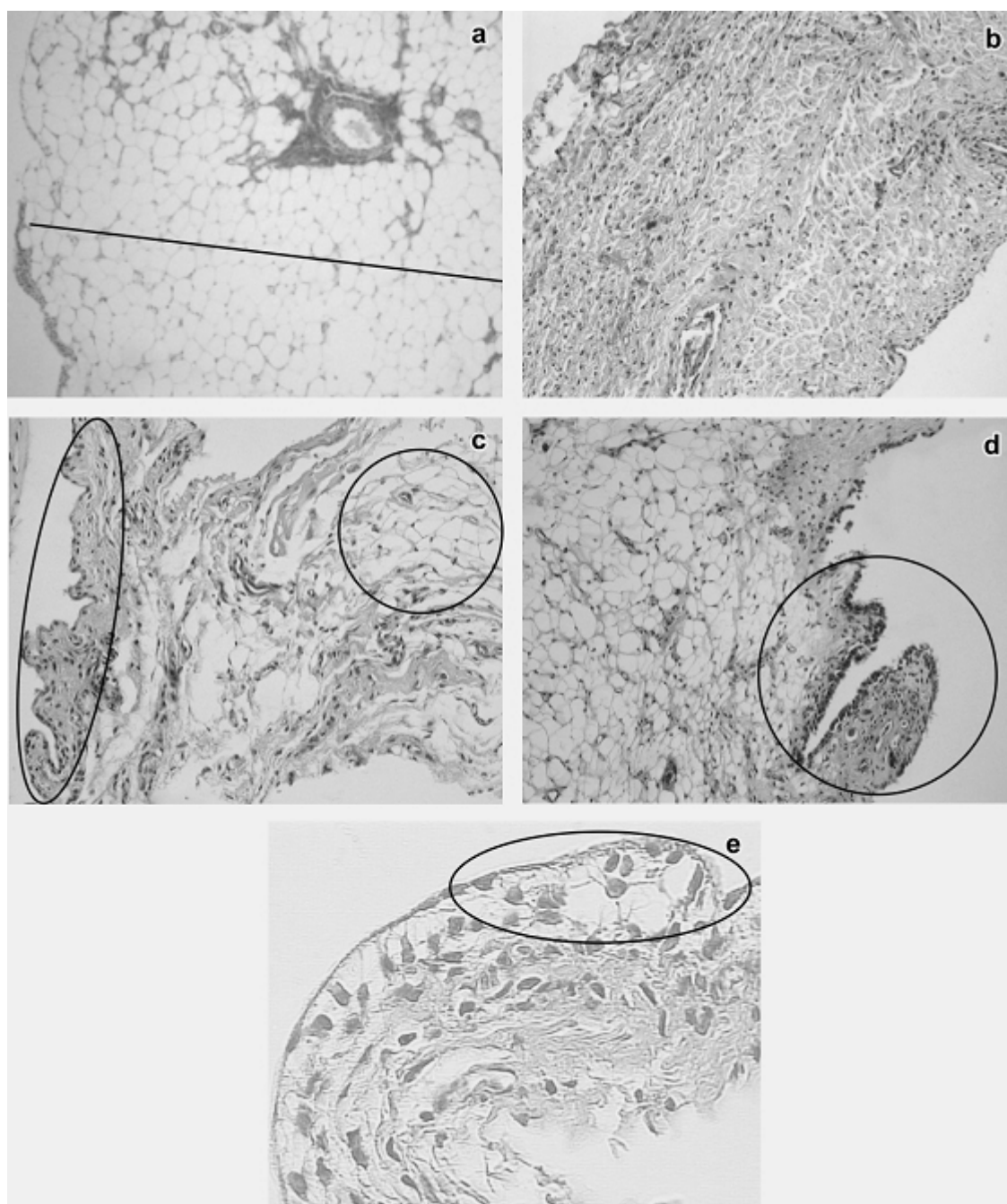
Na avaliação histológica da cápsula articular, observou-se no G2 espessamento da cápsula com substituição total do tecido adiposo por tecido conjuntivo fibroso (Figura 1b) em relação ao controle (Figura 1a). No G3, em um animal houve substituição total, porém os outros comportaram-se como os do G4, com espessamento, mas também substituição parcial do tecido adiposo por tecido conjuntivo fibroso (Figura 1c). Infere-se que tanto o exercício livre (G3) quanto o orientado (G4) influenciaram positivamente o retorno das condições morfológicas da cápsula, anteriores à imobilização.

Após 45 dias de imobilização, observaram-se, nos animais dos grupos 2, 3 e 4, rigidez articular e hipotrofia da musculatura. Durante a coleta da cápsula, nesta época, ela se encontrava espessa e aderida à articulação, reduzindo o espaço articular.

Em todos os animais do G2, ocorreu substituição do tecido adiposo por tecido fibroso e aumento da vascularização. Foram observados aumento da espessura da membrana sinovial e aumento do volume nuclear dos sinoviócitos. Nos animais dos grupos 3 e 4, foram

observados aumento da espessura da membrana sinovial e presença de vilos (Figura 1d). Os sinoviócitos dos animais do G4 encontravam-se vacuolizados (Figura 1e).

Clinicamente, essas modificações traduziram-se em rigidez e diminuição da amplitude articular.



**Figura 1** - Detalhes histológicas da cápsula articular. **a:** animal do G1 (controle). Cápsula normal com grande quantidade de tecido adiposo (linha); **b:** animal do G2, substituição do tecido adiposo por tecido conjuntivo fibroso; **c:** animal do G3, substituição parcial do tecido adiposo (círculo) por tecido conjuntivo fibroso (elipse); **d:** animal do G3, espessamento da membrana sinovial e presença de vilos (círculo). HE. 200X; **e:** animal do G4, vacuolização dos sinoviócitos (elipse). HE. 400X.

Essas conclusões estão de acordo com as de Roy (1970) e Finsterbush & Friedman (1973), que associaram hiperplasia sinovial, formação de vilos e proliferação celular na camada mais superficial de articulações imobilizadas. Os variados graus de degeneração observados nas células sinoviais resultaram em diminuição da produção de fluido sinovial e redução do suprimento nutricional à cartilagem. Conseqüentemente, a degeneração da cartilagem articular, vista ao longo das análises, deveu-se à atrofia da membrana sinovial, determinando menor produção de líquido sinovial e ausência de bombeamento ocasionado pela imobilização, que inibiu a difusão da menor quantidade de líquido sinovial que estava sendo produzida, concordando com Roy (1970).

Também deve-se considerar que a cápsula articular e a membrana sinovial respondem à imobilização, aumentando a sua espessura, que está funcionalmente associada à rigidez articular e a uma diminuição da amplitude de movimento. Com relação a esses aspectos, o exercício monitorado, sem impacto, como preconizado, determinou melhorias como a evolução favorável da marcha.

Com relação à cartilagem articular nos animais do grupo 2, a avaliação das lâminas coradas por azul de toluidina demonstrou perda de metacromasia, a partir do osso subcondral, indicando perda dos componentes sulfatados da matriz da cartilagem. Entretanto, nos grupos 3 e 4, houve perda abrupta de metacromasia em áreas onde a cartilagem estava lesada. Esses resultados estão de acordo com Finsterbush & Friedman (1973) e Troyer (1975), já que, em articulações imobilizadas, as mudanças metabólicas com perda da coloração metacromática da matriz cartilaginosa são prévias a quais quer mudanças morfológicas evidentes na microscopia óptica.

O movimento articular é importante para a manutenção e renovação dos proteoglicanos da cartilagem articular saudável. A perda dos proteoglicanos após a imobilização é reversível com programas de remobilização articular (Culav *et al.*, 1999). Portanto, os exercícios impostos aos animais dos grupos 3 e 4 permitiram aos condrócitos restaurar parcialmente os componentes da matriz, indicando que o movimento *per si*, sem sustentação do peso, contribuiu para restaurar os

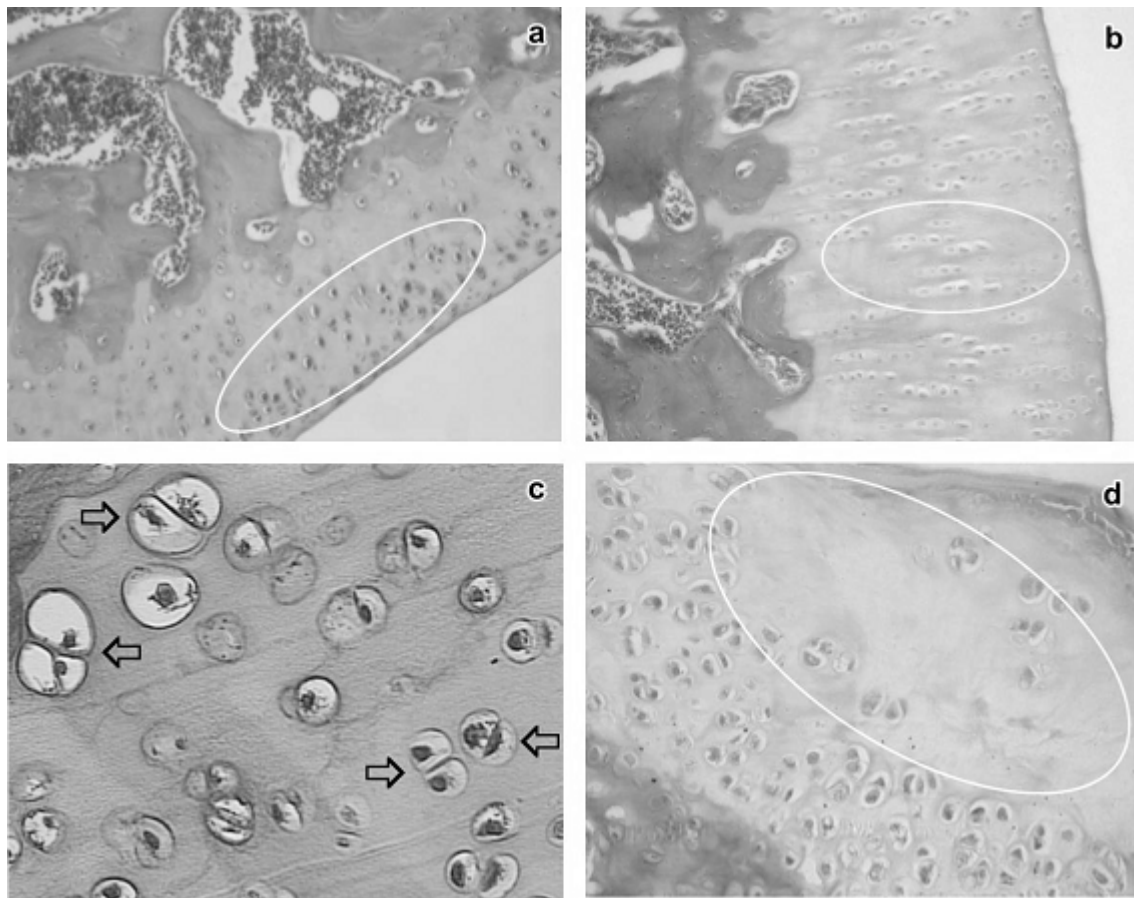
proteoglicanos da cartilagem articular.

Deve-se enfatizar que as melhoras advindas da atividade física devem ser relativizadas à intensidade do exercício. Foi estabelecido para os cães (Palmoski, 1981) um regime forçado de corrida (processo de reabilitação acelerado). Observou-se que os proteoglicanos recém-sintetizados não se depositaram, efetivamente, dentro da matriz e que os defeitos na cartilagem permaneceram indefinidamente. Foi constatado também que, embora tivesse ocorrido aumento na síntese de proteoglicanos imediatamente após a remobilização, grande quantidade foi recuperada no líquido sinovial.

Essas conclusões permitem inferir que alguns pacientes que possuem diagnóstico de osteoartrite pós-traumática de fato têm osteoartrite pós-reabilitação se submetidos a esforços excessivos, re-impondo carga à cartilagem articular atrofiada, antes que os proteoglicanos da matriz extracelular sejam renovados suficientemente para proteger os condrócitos da carga mecânica.

Pode-se observar ainda, no G2, aumento da população de condrócitos nas zonas superficial e intermediária, dispostos de forma irregular (Figura 2a) e não em colunas como na cartilagem normal (Figura 2b), semelhantemente ao descrito por Hall (1963), pois, em áreas de contato de articulações imobilizadas, as células apresentam-se maiores que o normal e mais aglomeradas. Esta formação de grupos isógenos (Figura 2c) indica processo de divisão celular em resposta ao estresse anormal, constituindo-se em mecanismo natural de defesa da cartilagem (Piermattei & Flo, 1999).

No grupo 3, o aumento da população de condrócitos foi observado em oito animais, porém dois apresentaram diminuição da população de condrócitos com áreas de necrose na cartilagem articular (Figura 2d). Provavelmente essas áreas, estavam submetidas à sobrecarga por serem áreas de contato; nos animais do grupo 4, observou-se aumento da população de condrócitos, que pode ser explicado por Whiting & Zernicke (2001), pois a atividade física prolongada em animais pode produzir hipertrofia dos condrócitos e aumento do número de células por unidade de cartilagem.



**Figura 2** - Detalhes celulares na cartilagem articular. **a:** animal do G2, aumento da população de condrócitos nas zonas superficial e intermediária (elipse), dispostos de forma irregular HE. 200X; **b:** G1, condrócitos disposto em colunas (elipse). HE. 200X; **c:** animal do G2, grupos isógenos (setas). HE. 1000X; **d:** animal do G3, diminuição da população de condrócitos em áreas de necrose (elipse) na cartilagem articular. HE. 400X.

Com relação à cartilagem articular, em sete animais do grupo 2, nove do grupo 3 e seis do grupo 4 observou-se o avanço da linha de maré, com aumento da espessura da cartilagem calcificada. Acredita-se que este processo seja uma adaptação à alteração da biomecânica da articulação e à natureza e distribuição de forças aplicadas na região superficial da cartilagem articular, adjacente ao espessamento (Burr, 2004). Contrariando as conclusões de Vanwanseele *et al.*, (2002), os animais do grupo imobilizado não apresentaram aumento da espessura da cartilagem calcificada. Talvez, porque os animais do experimento estiveram imobilizados por 28 dias. Esses resultados foram semelhantes aos observados em cães imobilizados durante quatro semanas por Leroux *et al.* (2001), provavelmente, porque a observação no estudo de Narmoneva *et al.* (2002) tenha ocorrido apenas na região de ausência de contato na tíbia.

Em um animal do G2, em oito do G3 e três do G4, foi encontrada formação de tecido conjuntivo fibroso sobre a superfície articular em áreas de ausência de contato e próxima ao menisco, proveniente da cápsula articular, o que pode ser uma resposta primária à limitação de movimento.

Com a limitação prolongada do movimento, as superfícies articulares que não mantinham contato com a superfície oposta foram cobertas pelo tecido conjuntivo que proliferou. Já nos pontos de contato entre o tecido conjuntivo e a cartilagem, formaram-se aderências transitórias e outras permanentes que determinaram mudanças nas células cartilaginosas. Infere-se que o aparecimento do tecido conjuntivo e a conseqüente diminuição da espessura da cartilagem podem ter sido causados pela perda de adequada nutrição superficial e pela ausência do movimento. Em algumas regiões, a cartilagem estava calcificada, não sendo mais



observados a matriz e os condrócitos.

Observou-se em três animais do G2 células com núcleo picnótico, provavelmente numa fase da apoptose ou necrose celular. Em seis animais foi observada penetração vascular na periferia da cartilagem, achado também relatado por Hall (1963). Esses vasos sanguíneos adentravam a cartilagem a partir do osso subcondral, numa tentativa de levar células e nutrientes a região lesada.

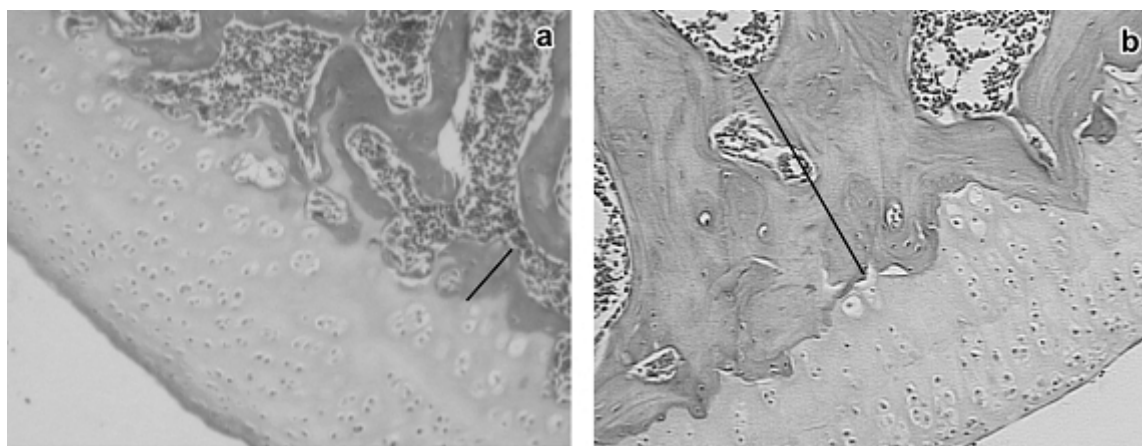
Pela avaliação do osso subcondral, observou-se em sete animais do G3 e três animais do G4, sempre na periferia da cartilagem e no mesmo local, tecido conjuntivo vascular preenchendo o espaço medular imediatamente adjacente à cartilagem, onde surgiam túneis vasculares que se dirigiam e penetravam dentro da camada profunda da cartilagem, destruindo o platô subcondral. Algumas evidências de reabsorção trabecular foram encontradas com a manifestação da atividade de osteoclastos, diferentemente das observações de Evans *et al.* (1960), em que essas alterações ocorreram após 60 dias de imobilização. Esta discrepância no tempo de aparecimento das alterações pode ser atribuída às diferenças nos métodos de imobilização das articulações, no tempo de imobilização e na associação de exercícios.

O aparecimento de tecido conjuntivo muito vascular ou tecido de granulação no espaço medular subcondral pode ser explicado de duas maneiras: como uma reação de cura em resposta ao dano limitado na cartilagem, numa tentativa dos vasos medulares suprirem elementos de nutrição e reparo; ou como uma reação de cura da lesão no osso subcondral causada por

esforços transmitidos através da cartilagem, que presumivelmente fatigam e fraturam a placa subcondral. Segundo Evans *et al.* (1960), desde que a erosão da cartilagem tenha ocorrido abaixo ou através da placa subcondral, ou se houver uma fenda conectando o osso subcondral e a cartilagem, o desenvolvimento de lesão subcondral pode ser esperado.

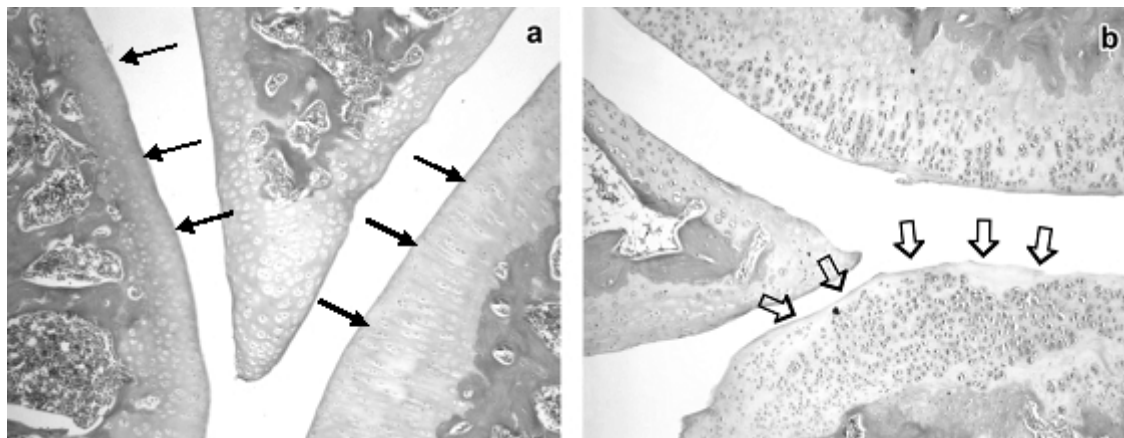
Deve-se considerar ainda que fendas conectando o osso subcondral e a medula à cartilagem podem ser estabelecidas sem fraturas, porque nas placas subcondrais de animais normais existem muitas aberturas pelas quais passam pequenos vasos que formarão leitos vasculares nas camadas profundas da cartilagem. Com a fenda da matriz ou fissuras da cartilagem poderá haver comunicação com uma dessas aberturas. Provavelmente, houve uma combinação de fatores que determinaram a resposta subcondral.

Em nove animais do grupo 3 e outros nove do 4, foram observadas áreas com aumento da espessura do osso subcondral (Figuras 3a e b), em decorrência da alteração da mecânica articular desencadeada pela perda da capacidade da cartilagem adjacente de absorver estresse mecânico. O osso subcondral ficou sujeito à maior carga e, como resposta, houve aumento de sua espessura. O osso tornou-se mais espesso, perdeu característica trabecular, conseqüentemente, deformando-se menos diante das forças que são depositadas sobre a articulação. Com isso, forças maiores e nos dois sentidos foram exercidas sobre a cartilagem, que já estava anormal, resultando em danos ainda maiores sobre os condrócitos e a matriz cartilaginosa.



**Figura 3** – Detalhes histológicos da superfície articular. **a:** animal do G1, espessura do osso subcondral (traço preto); **b:** animal do G3, aumento da espessura do osso subcondral (traço preto) em relação ao controle. HE. 100X.

Nove animais do G3 e cinco do G4 apresentaram irregularidade da superfície articular do fêmur e da tibia (Figuras 4a e b), o que pode ser explicado pelo fato de a integridade da cartilagem articular ser dependente das propriedades mecânicas do seu leito subcondral. O espessamento do osso subcondral pode também afetar a conformação articular, criando áreas de contato máximo embaixo da carga a que está sujeito. A



**Figura 4** – Detalhes histológicos da superfície articular. **a:** animal do G1, regularidade da superfície articular normal (setas); **b:** animal do G3, superfície articular irregular (setas). HE. 40X.

Após remover a imobilização, os animais do G3 iniciaram a deambulação sem qualquer preparação da articulação, que se encontrava pouco lubrificada, com nutrição deficiente, com alteração da mecânica articular pela perda dos componentes da matriz (Leroux *et al.*, 2001; Narmoneva *et al.*, 2002), espessamento e fibrose da cápsula articular e atrofia muscular, resultando sobrecarga articular, alterações celulares da cartilagem, lesões severas com áreas de necrose, irregularidade das superfícies articulares e, no osso subcondral, aumento da espessura e reabsorção trabecular.

Os animais do G4, que foram submetidos à natação, apesar de apresentarem algumas das lesões próprias do processo degenerativo imposto pela imobilização, apresentaram quadro menos severo. A natação determinou alívio do estresse das articulações, permitindo a realização de movimentos em forças gravitacionais reduzidas (Campion, 2000), diminuindo as forças de compressão e movimentos de fricção. Isso facilitou a difusão do líquido sinovial, lubrificando e, assim, nutrindo a cartilagem e permitindo o deslizamento das superfícies. A natação também

cartilagem articular é viscoelástica e o osso tem um comportamento elástico sob cargas fisiológicas (Burr, 2004). Então, é lógica a hipótese de que forças impulsivas (súbitas) são mais destrutivas do osso e da cartilagem do que as forças aplicadas gradualmente e de igual valor. Microdanos cumulativos repetitivos levam a remodelamento, espessamento ósseo e lesão da cartilagem.

promoveu o fortalecimento da musculatura envolvida na dinâmica articular, diminuindo a sobrecarga articular, como citado por Campion (2000).

## CONCLUSÕES

1) A imobilização prolongada da articulação femorotibiopatelar por 45 dias determina perda de proteoglicanos da matriz cartilaginosa, aumento do número de condrócitos, aumento da espessura da cartilagem calcificada, irregularidade da superfície articular, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e aumento da espessura do osso subcondral.

2) Como a degeneração demonstrada pelas células sinoviais, em decorrência da imobilização, resulta em diminuição da produção de fluido sinovial e redução do suprimento nutricional à cartilagem, tanto o exercício livre quanto o orientado influenciam positivamente no retorno das condições morfológicas da cápsula articular, anteriores à imobilização.

3) Os animais imobilizados e submetidos à

atividade livre e à natação, apresentam menor número de alterações tanto na cartilagem articular como no osso subcondral, quando comparados com aqueles imobilizados e mantidos em atividade livre.

## REFERENCIAS

- Brandt KD (2003) Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arthritis & Rheumatism* 49:267-271.
- Burr DB (2004) Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 10:1-11.
- Campion MR (2000) Os efeitos fisiológicos, terapêuticos e psicológicos da atividade aquática; Física básica: forma e densidade. In: \_\_\_ Hidroterapia princípios e prática. São Paulo, Manole. p.3-4 e 14-22.
- Collins K (1998) Efeitos térmicos. In: Kitchen S, Bazin, S Eletroterapia de Clayton. 10 ed. São Paulo, Manole. p.89-104.
- Culav EM, Clark CH & Merrilees MJ (1999) Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Physical Therapy* 79:308-319.
- Evans EB, Eggers GWN & Butler JK (1960) Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. *Journal of Bone and Joint Surgery* 642A: 737-758.
- Finsterbush A & Friedman B (1973) Early changes in immobilized rabbits knee joints: a light and electron microscopic study. *Clinical Orthopedics and Related Research* 92:305-319.
- Haapala J, Arokoski JP & Hyttinen MM (1999) Remobilization does not full restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 362:218-229.
- Hall MC (1963) Cartilage changes after experimental immobilization of the joint of the young rat. *Journal of Bone and Joint Surgery* 45A:36-44.
- Leroux MA, Cheung HS & Bau JL (2001) Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis and Cartilage* 9:633-640.
- Narmoneva DA, Cheung HS & Wang JY (2002) Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model. *Journal of Orthopaedic Research* 20:83-91.
- Palmoski MJ (1981) Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. *Arthritis & Rheumatism* 24:1329-1337.
- Piermattei DL & Flo GL (1999) Articulações. In: \_\_\_ Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais. São Paulo, Manole. p.161-176.
- Roy S (1970) Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization. *Annals of the Rheumatic Diseases* 29:634-642.
- Salter RB (1985) Os princípios gerais e métodos específicos do tratamento músculo-esquelético, In: \_\_\_ Distúrbios e Lesões do Sistema Músculo-Esquelético. 2 ed. Rio de Janeiro, Medsi. p.73-95.
- Troyer, H (1975) The effect of short-term immobilization on the rabbit knee joint cartilage. A histochemical study. *Clinical Orthopedics and Related Research* 107:249-257.
- Vanwanseele B, Lucchinetti E & Stussi E (2002) The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis and Cartilage* 10:408-419.
- Whiting WC & Zernicke RF (2001) Biomecânica e adaptação dos tecidos, In: \_\_\_ Biomecânica da Lesão Musculoesquelética, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.83-105.

*Aceito para publicação em 28/03/2006*