

CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA FRANCIOZI

**EFEITOS DO EXERCÍCIO DE *ULTRA-ENDURANCE*
NA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS
TREINADOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Faloppa

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Helena Bonciani Nader

SÃO PAULO

2011

Franciozi, Carlos Eduardo da Silveira.

EFEITOS DO EXERCÍCIO DE *ULTRA-ENDURANCE* NA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS TREINADOS. / Carlos Eduardo da Silveira Franciozi. -- São Paulo, 2011. XVIII, 137f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Effects of the ultra-endurance exercise in the articular cartilage of trained rats.

1. Cartilagem Articular. 2. Osteoartrite. 3. Corrida. 4. Condicionamento Físico Animal. 5. Ratos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
PLÁSTICA**

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

A meus pais por me darem a vida e me ensinarem a semear.

A meus irmãos por brincarem comigo na plantação e com ela crescermos.

A minha família por me ensinar as tradições.

A meus amigos por me ajudarem a adubar a terra e dividir a colheita.

A meus mestres por me ensinarem a linguagem da natureza.

A minha esposa por iluminar, cuidar e comigo colher os frutos.

A Cristo por nos dar o sol, a água e as sementes.

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. **FLÁVIO FALOPPA**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo exemplo de caráter e conduta, confiança depositada, abertura dos caminhos e tempo e paciência encontrados em meio a inúmeras responsabilidades para me orientar na elaboração desta tese.

A PROFA. DRA. **HELENA BONCIANI NADER**, Professora Titular da Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelos ensinamentos e autorização do trabalho.

Ao PROF. DR. **EDUARDO KATCHBURIAN**, Professor Titular do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelos pilares de conhecimento construídos que possibilitaram a elaboração desta tese.

A PROFA. **REJANE DANIELE REGINATO**, Professora Adjunta e Chefe da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pela orientação, iniciação nas ciências básicas, aulas, correções, fundamentos, empréstimos de material e auxílio na elaboração desta tese.

A DRA. **VALQUÍRIA PEREIRA DE MEDEIROS** da Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo pela orientação, paciência,

supervisão, amizade, ensinamentos, aulas e auxílio na concretização desta tese.

Ao PROF. **MÁRIO FERRETTI FILHO** do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo pela orientação e conhecimento específico possibilitando o melhor entendimento e integração dos resultados.

Ao colega e amigo **VICTOR ALEXANDRE FERREIRA TARINI**, pós-graduando em nível de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, por sua amizade, visão empreendedora, tenacidade, capacitação em pesquisa, companheirismo e idealização desta tese.

A aluna de Iniciação Científica **PATRÍCIA DOS REIS SOUSA GONÇALVES** por sua amizade, competência, companheirismo, capacitação excepcional com muitas vezes inversão dos papéis co-orientador/orientada, horas despendidas na preparação dos materiais e auxílio na concretização desta tese.

Ao aluno de Iniciação Científica **JAIME PICCARO ERAZO** pelo auxílio na elaboração desta tese.

A aluna **GRACE RICHTER MOYSÉS** pelo auxílio na elaboração desta tese.

Ao pós-graduando **RAFAEL PACHECO DA COSTA** pela prestatividade, competência e auxílio na concretização desta tese.

A tia **ROSELI DE NAZARÉ PEREIRA PASCHOA** pela amizade, companheirismo, capacitação, orientações, broncas e incontáveis horas de auxílio, sem os quais, não teria sido possível a elaboração desta tese.

Aos meus pais **VÂNIO LUIZ FRANCIOZI** e **SYLVIA LEONOR DA SILVEIRA FRANCIOZI** pelo envolvimento e auxílio na elaboração desta tese.

Ao meu irmão **LUIS HENRIQUE DA SILVEIRA FRANCIOZI**, pela amizade, prestatividade, proficiência na língua portuguesa e noites mal dormidas em virtude do auxílio na elaboração desta tese.

Aos meus irmãos **MAURÍCIO FERNANDO DA SILVEIRA FRANCIOZI** e **VINÍCIO AUGUSTO DA SILVEIRA FRANCIOZI** e minha família, incluindo meu tio Tulum, pelo apoio incondicional na elaboração desta tese.

Ao meu estimado amigo e chefe de equipe Dr. **LEONARDO JOSÉ BERNARDES ALBERTONI** pela amizade e excelso caráter moral com ideais e princípios elevados que permitiram a realização desta tese, além dos inúmeros auxílios com orientações e correções.

Aos meus amigos e colegas de residência Dr. **DANIEL GONÇALVES DOCA**, Dr. **DAVID DEL CURTO**, Dr. **GUSTAVO CHAVES NACIF**, Dra. **KARINA LEVY SIQUEIRA**, Dr. **MARCEL JUN SUGAWARA TAMAOKI**, Dr. **MARCEL RAMOS ANDRADE LEITE**, Dr. **MÁRIO PIERRY**, Dr. **MAURÍCIO AYRES DE OLIVEIRA** e Dr. **RENATO HIROSHI SALVIONI UETA** por compartilharem comigo um mesmo caminho, dividindo experiências boas e ruins e vencendo vários percalços que contribuíram em nossa moldagem moral, amizade e companheirismo aplicados na elaboração desta tese.

Aos meus amigos do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo pelo apoio na elaboração desta tese.

Aos meus amigos de longa data pela alegria que compartilhamos com nossos encontros e conquistas, usada como motivação na elaboração desta tese.

A minha esposa, meu amor, minha amiga, minha companheira, **JULIANA VILELA MATHEUS FRANCIOZI** por compartilhar comigo as dificuldades e superações necessárias para a elaboração, o amadurecimento, a formatação e a concretização desta tese.

Agradeço a **CAPES** que forneceu suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
LISTAS	xii
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
RESUMO	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO..	6
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. LITERATURA	9
3.1. Cartilagem Articular	10
3.2. Osteoartrose	14
3.3. Estresse Mecânico e Cartilagem	17
3.3.1. Exercício Físico Benéfico para Cartilagem e Osteoartrose	20
3.3.2. Exercício Físico Excessivo Sem Relação com Osteoartrose ...	24
3.3.3. Exercício Físico Excessivo Relacionado à Osteoartrose	27
3.4. Métodos Avaliação Cartilagem	30
3.5. Protocolos de Treinamento Animal	33
4. MÉTODOS	36

4.1. Animal de Experimentação.....	37
4.2. Equipamento	38
4.3. Critérios Treinabilidade	39
4.4. Procedimento Experimental	39
4.5. Preparo do Material Histológico	42
4.6. Análise Histomorfológica.....	42
4.7. Técnica Histoquímica <i>Alcian Blue</i> pH 0,5	46
4.8. Extração dos Glicosaminoglicanos	48
4.8.1. β -Eliminação	49
4.8.2. Distinção e Quantificação dos Glicosaminoglicanos Sulfatados.....	49
4.9. Quantificação do Ácido Hialurônico	51
4.9.1. Detecção do Ácido Hialurônico por Histoquímica	52
4.10. Técnica Histoquímica <i>Picro-Sirius-Red</i> para Avaliação do Colágeno	53
4.11. Análise Estatística	54
5. RESULTADOS	55
5.1. Análise Histomorfológica.....	56
5.1.1. Contagem de Condrócitos das Zonas Superficial e Intermediária Agrupadas e da Zona Profunda da Cartilagem Articular na Área de Não Carga	56
5.1.2. Contagem de Condrócitos das Zonas Superficial e Intermediária Agrupadas e da Zona Profunda da Cartilagem Articular na Área de Carga	60
5.1.3. Contagem dos Pares de Clones de Condrócitos da Cartilagem Articular	63
5.1.4. Classificação Histológica de Osteoartrose da <i>Osteoarthritis Research Society International</i> (OARSI)	66

5.1.5. Espessuras da Cartilagem Articular e da Linha Epifisial	69
5.2- Análise Histoquímica pela Técnica <i>Alcian Blue</i> pH 0,5.....	72
5.2.1. Análise Histoquímica da Cartilagem Articular pela Técnica <i>Alcian Blue</i> pH 0,5.....	72
5.2.2. Análise Histoquímica da Linha Epifisial pela Técnica <i>Alcian Blue</i> pH 0,5	75
5.3- Extração e Quantificação dos Glicosaminoglicanos Sulfatados da Cartilagem Articular.....	78
5.4. Quantificação e Detecção do Ácido Hialurônico da Cartilagem Articular	81
5.5. Técnica Histoquímica <i>Picro-Sirius-Red</i> para Avaliação do Colágeno	84
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÃO	104
8. REFERÊNCIAS	106
NORMAS ADOTADAS	130
ABSTRACT.....	131
ANEXOS	133
FONTES CONSULTADAS.....	136

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Treinamento dos ratos em esteira rolante modelo AVS (<i>AVS projetos São Paulo – Brasil</i>).....	38
Figura 2 Fotomicrografia da cartilagem articular (CA), com representações de áreas das zonas superficial e intermediária para a contagem de condrócitos. Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento 10x.....	43
Figura 3 Fotomicrografia demonstrando as medidas histomorfométricas para análise de espessura da cartilagem articular (CA) e linha epifisial (LE). Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento 2,5x.....	44
Figura 4 Sistema ImageLab, utilizado para análise dos GAGs sulfatados nas imagens digitalizadas de lâminas submetidas ao teste histoquímico <i>Alcian Blue</i> pH 0,5. Aumento 40x.....	47
Figura 5 Gráfico da média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas da cartilagem articular na área de não-carga	58
Figura 6 Gráfico da média do número de condrócitos da zona profunda da cartilagem articular na área de não-carga	58
Figura 7 Fotomicrografias da cartilagem articular do grupo controle (GC) e grupo treinado (GT) corados com Hematoxilina-Eosina mostrando a diferença do número de condrócitos na cartilagem articular (CA). Aumento 40x.....	59
Figura 8 Gráfico da média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas da cartilagem articular na área de carga	62
Figura 9 Gráfico da média do número de condrócitos da zona profunda da cartilagem articular na área de carga	62
Figura 10 Gráfico da média do número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular	65
Figura 11 Fotomicrografias da cartilagem articular (CA) do grupo controle (GC) e grupo treinado (GT) corados com Hematoxilina-Eosina ilustrando a diferença do número de	

pares de clones de condrócitos. Aumento 40x.....	65
Figura 12 Gráfico classificação OARSI	68
Figura 13 Fotomicrografia da cartilagem articular do grupo treinado (GT) apresentando células de aspecto irregular com características de morte celular. Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento 40x.....	68
Figura 14 Gráfico da espessura da cartilagem articular	71
Figura 15 Gráfico da espessura da linha epifisial	71
Figura 16 Gráfico da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da cartilagem articular	74
Figura 17 Fotomicrografias da cartilagem articular do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT) coradas com <i>Alcian Blue</i> pH 0,5. Aumento 40x.....	74
Figura 18 Gráfico da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da linha epifisial	77
Figura 19 Fotomicrografias da linha epifisial do do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT) corados com <i>Alcian Blue</i> pH 0,5. Aumento 40x.....	77
Figura 20 Gráfico da média de quantificação dos GAGs sulfatados da cartilagem articular	79
Figura 21 Eletroforese após β -eliminação do grupo controle e grupo treinado. (1)RC- Rato do grupo controle (2)RT- Rato do grupo treinado (3)P- Concentrações conhecidas dos glicosaminoglicanos CS,DS e HS aplicadas ao gel de agarose (4)CS- condroitim sulfato (5)DS- dermatam sulfato (6)HS- heparam sulfato.....	80
Figura 22 Gráfico da quantificação AH da cartilagem articular	82
Figura 23 Detecção do AH por método histoquímico. Fotomicrografias dos fêmures distais do grupo controle e do grupo treinado. Cromógeno DAB líquido e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Aumento 2,5x.....	83
Figura 24 Fotomicrografias da cartilagem articular do grupo controle (GC) e grupo treinado (GT) coradas com <i>Picro-Sirius-Red</i> . Aumento 40x.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise estatística do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de não carga	56
Tabela 2	Média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de não carga	57
Tabela 3	Análise estatística do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de carga	60
Tabela 4	Média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de carga	61
Tabela 5	Análise estatística do número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular	63
Tabela 6	Número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular	64
Tabela 7	Análise estatística da classificação OARSI	66
Tabela 8	Classificação OARSI	67
Tabela 9	Análise estatística das espessuras da cartilagem articular e da linha epifisial	69
Tabela 10	Espessuras da cartilagem articular e da linha epifisial	70
Tabela 11	Análise estatística da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da cartilagem articular	72
Tabela 12	Quantificação percentual dos GAGs sulfatados da cartilagem articular	73
Tabela 13	Análise estatística da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da linha epifisial	75

Tabela 14	Quantificação percentual dos GAGs sulfatados da linha epifisial	76
Tabela 15	Análise estatística da quantificação dos GAGs sulfatados da cartilagem articular	78
Tabela 16	Quantificação dos GAGs sulfatados da cartilagem articular	79
Tabela 17	Análise estatística da quantificação do AH da cartilagem articular	81
Tabela 18	Quantificação do AH da cartilagem articular	82
Tabela 19	Análise estatística do grau de positividade do colágeno ...	84

LISTA DE ABREVIATURAS

PG	Proteoglicano
GAG	Glicosaminoglicano
AH	Ácido Hialurônico
IL-1 β	Interleucina-1 β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alpha
MMP	Metaloproteinases de Matriz
NO	Óxido Nítrico
iNOs	<i>inducible NO synthase</i>
MPa	Mega Pascal
Pa	Pascal (equivalente a Newton por Metro Quadrado)
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
HHGS	<i>Histological-Histochemical Grading System</i>
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPM - UNIFESP	Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
V	Volt
mA	Miliampere
GT	Grupo Treinado
GC	Grupo Controle
V _{máx}	Velocidade Máxima
VO ₂ máximo	Consumo de Oxigênio
PBS	Tampão Fosfato Salino

H.E.	Hematoxilina de Carazzi e Eosina de Lison
CA	Cartilagem Articular
μm^2	Micrometros Quadrados
LE	Linha Epifisial
pH	Potencial Hidrogeniônico
H+	Íon Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
N	Normal
RGB	Média da composição das cores vermelho, verde e azul no sistema <i>ImageLab</i>
%	Porcentagem
mg	Miligrama
ml	Mililitro
μm	Micrometros
μL	Microlitros
μg	Microgramas
°C	Graus Celsius
PDA	Diaminopropano Acetato
rpm	Rotações por Minuto
NaOH	Hidróxido de Sódio
CS	Condroitim Sulfatos
DS	Dermatam Sulfatos
HS	Heparam Sulfatos
HEP	Heparinas
V/cm	Volts por Centímetro
CETAVLON	Brometo de Cetiltrimetilamônio
M	Molar
m/min	Metros por Minutos

RESUMO

Introdução: O exercício físico é um hábito difundido com comprovados benefícios à saúde. Quando praticado em intensidade leve e moderada, acarreta alterações benéficas na cartilagem, sendo até mesmo preconizado no tratamento da artrose. Porém, a relação entre o exercício excessivo e a osteoartrose ainda é controversa. **Objetivo:** Avaliar se o exercício excessivo pode acarretar osteoartrose utilizando um novo protocolo denominado treinamento de *ultra-endurance* em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC) com 12 animais e grupo treinado (GT) com 12 animais. Os animais do GT foram submetidos a um treinamento de corrida em esteira com melhora progressiva do condicionamento físico durante 12 semanas realizando um exercício final de corrida até exaustão, tendo percorrido pelo menos 55 km nessas 12 semanas. Ao término desse período, todos os animais foram sacrificados e seus joelhos removidos para estudo hitomorfométrico, histomorfológico, histoquímico, eletroforético e fluorimétrico. **Resultados:** Houve diferenças significativas entre os dois grupos. O GT apresentou maior número de condrócitos, um importante aumento no número de pares de clones de condrócitos, uma quantidade de condrócitos em processo de morte celular expressivamente maior, alcançando graus mais elevados da classificação histológica de osteoartrose e uma marcante diminuição dos glicosaminoglicanos sulfatados e do ácido hialurônico. **Conclusões:** A cartilagem articular dos ratos treinados submetidos ao exercício de *ultra-endurance* demonstrou alterações predisponentes do processo osteoartrósico através de modificações celulares patológicas como aumento dos pares de clones de condrócitos e aumento da quantidade de condrócitos com características de morte celular, além da diminuição expressiva de componentes da matriz extracelular como os glicosaminoglicanos sulfatados e o ácido hialurônico.

1 – INTRODUÇÃO

Atualmente, a prática de exercício físico é um hábito difundido na população mundial. Os efeitos benéficos de um estilo de vida que envolva a prática de exercícios físicos já são bem estabelecidos, além de o sedentarismo ser estimado como uma das três principais causas evitáveis de morbidade, mortalidade e incapacidade nos países desenvolvidos (STEPHENSON *et al.*, 2000; TANASESCU *et al.*, 2002; SIGAL *et al.*, 2004).

Com relação à prática de atividades físicas, é sabido que há uma menor participação das mulheres, um declínio com a idade e uma frequência menor em grupos com baixo nível sócio-econômico. O aumento da prática de exercício físico é objetivo constante nas políticas governamentais e fundos de investimento advindos de empresas, ainda que faltem estudos de boa qualidade avaliando intervenções que objetivam o aumento dessa atividade (PRIEST *et al.*, 2008).

No organismo, o exercício físico acarreta alterações tróficas nos ossos, músculos, cartilagem articular e tendões, uma vez que a transmissão de cargas mecânicas requer a participação de todos esses elementos, sendo os mesmos sensíveis à magnitude, duração e natureza do estímulo mecânico (MAGNUSSON *et al.*, 2007; BERGMANN *et al.*, 2010; SUN, 2010). Dentre os tecidos afetados pelo nível de atividade física do indivíduo, destaca-se a cartilagem articular que compõe a superfície das articulações sinoviais. Sua composição complexa promove uma superfície de suporte, absorção e transferência de carga que permite a movimentação das articulações sem atrito, dissipando parte da carga (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008). A cartilagem articular adapta-se às

condições mecânicas a que é submetida. A atividade biossintética dos condrócitos é responsiva aos estímulos mecânicos, podendo assim alterar a morfologia e a composição do tecido (CHEN *et al.*, 1999; KURZ *et al.*, 2001; MOREL e QINN, 2004; CARTER *et al.*, 2004).

Para que uma articulação sinovial permaneça saudável, faz-se necessária a presença de uma cartilagem com homeostase balanceada entre os processos de anabolismo e catabolismo. O desequilíbrio entre a síntese e a degradação leva à degeneração (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008). A osteoartrose é uma doença que afeta a integridade funcional e estrutural da cartilagem, sendo caracterizada pelo seu processo degenerativo, inflamação da membrana sinovial, alterações periarticulares e do osso subcondral (GOLDRING e GOLDRING, 2007). Ela pode ser dividida em primária, quando não é identificada uma causa aparente ou secundária, quando é causada por algum fator conhecido como alteração mecânica, inflamatória, metabólica ou outros (BUCKWALTER e MARTIN, 2006; HERRERO-BEAUMONT *et al.*, 2009).

Os efeitos do exercício físico na cartilagem articular permanecem motivo de debates e especulações, assim como sua relação com a osteoartrose. Sabe-se que os exercícios praticados com intensidade leve, moderada e forte, até determinado ponto, causam efeitos benéficos na cartilagem, sendo também preconizados como parte do tratamento da osteoartrose (ETTINGER *et al.*, 1997; RODDY *et al.*, 2005; ROOS e DAHLBERG, 2005; MIKESKY *et al.*, 2006; FRANSEN e McCONNELL, 2008; JAMTVEDT *et al.*, 2008; LUND *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008, BOSOMWORTH, 2009; HELMARK *et al.*, 2011). No entanto, o exercício mais intenso permanece como uma lacuna

a ser desvendada em relação às conseqüências para a cartilagem, sendo ainda hoje uma pergunta sem resposta se o exercício excessivo causa osteoartrose. Essa dúvida perpetua-se devido a estudos conflitantes apresentados na literatura. Das modalidades de exercício excessivo estudadas ao longo dos anos, grande destaque é dado às corridas de longa distância.

Diversos trabalhos como os de SOHN e MICHELI (1985); PANUSH *et al.* (1986), HANNAN *et al.* (1993), LANE *et al.* (1993), LANE *et al.* (1998), BUCKWALTER e MARTIN (2004), CYMET e SINKOV (2006), CHAKRAVARTY *et al.* (2008) e HUNTER e ECKSTEIN (2009) não demonstraram relação entre o nível de atividade física e a osteoartrose, apresentando por vezes uma incidência aumentada de osteófitos assintomáticos em radiografias e por vezes até demonstrando efeitos benéficos. Outros trabalhos como os de KUJALA *et al.* (1995), SPECTOR *et al.* (1996), TEITZ e KILCOYNE (1998), McALINDON *et al.* (1999) e CHENG *et al.* (2000) demonstraram um aumento na incidência ou no risco de osteoartrose com a prática de atividades físicas mais intensas. Portanto, a literatura atual não é suficiente para responder a pergunta que motivou a realização deste trabalho: “O exercício excessivo causa osteoartrose?”

Dentre as modalidades de exercício excessivo destaca-se o *ultra-endurance*, que é definido por NOAKES *et al.* (1990) como um exercício no qual são percorridas distâncias superiores a 50 km, ou segundo PETERS (2003), como um exercício com duração superior a quatro horas. Essa modalidade freqüentemente inclui corrida, esqui, ciclismo ou natação e tem se tornado popular através do “*Ironman Triathlon*” (ROBINS, 2007).

Tentando mimetizar esse tipo de exercício, foi criado um protocolo de treinamento animal utilizando ratos para avaliar os efeitos do exercício excessivo na cartilagem articular, sendo denominado treinamento de *ultra-endurance* em ratos. Os modelos animais de indução de osteoartrose são bem conhecidos e têm como principais funções o estudo da fisiopatologia dessa doença e o estudo de novas drogas utilizadas no seu tratamento. Os modelos com ratos descritos na literatura normalmente utilizam algum recurso cirúrgico como estimulação elétrica intracraniana através de eletrodos implantados na área de recompensa do cérebro animal, secção do ligamento cruzado anterior, lesão cirúrgica do menisco medial, uma combinação desses dois últimos métodos ou injeções intra-articulares de enzimas e agentes químicos (MCDEVITT e MUIR, 1976; WILLIAMS *et al.*, 1982; LOVÀSZ *et al.*, 1995; GUINGANP *et al.*, 1997; PAP *et al.*, 1998; STOOP *et al.*, 2000; KARAHAN *et al.*, 2001; JANUSZ *et al.*, 2002; GUZMAN *et al.*, 2003; GALOIS *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2005; WANCKET *et al.*, 2005; BOVE *et al.*, 2006; HAYAMI *et al.*, 2006; KALBHEN, 2006; LIN, HUANG, CHAI, 2006; REZENDE *et al.*, 2006; APPLETON *et al.*, 2007; JEAN *et al.*, 2007; YEH *et al.*, 2008; YORIMITSU *et al.*, 2008; BARAGI *et al.*, 2009; FLANNERY *et al.*, 2009; KALFF *et al.*, 2010; CHOCKALINGAM *et al.*, 2011).

Nosso modelo tem o objetivo de ser mais fisiológico e menos invasivo em relação aos previamente descritos, já que busca o aprimoramento das distâncias percorridas e prolongamento da duração do exercício baseado na melhora do condicionamento físico adquirido com o treinamento, visando assim a um melhor entendimento dos efeitos do exercício excessivo na cartilagem de uma articulação sadia.

2 - OBJETIVO

O objetivo do trabalho é tentar responder a pergunta: “O exercício excessivo causa osteoartrose?”

2.1 – Objetivo Geral

Determinar os efeitos do exercício de *ultra-endurance* na cartilagem articular de ratos treinados, buscando:

- Avaliar histomorfologicamente a cartilagem articular;
- Determinar o comportamento dos glicosaminoglicanos da cartilagem articular.

2.2 - Objetivos Específicos:

- Avaliar o número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na Área de Não Carga;
- Avaliar número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na Área de Carga;
- Avaliar o número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular;

- Classificar os cortes histológicos segundo a classificação histológica de osteoartrose proposta pela *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI);
- Avaliar a espessura da cartilagem articular;
- Avaliar a espessura da linha epifisial correlacionando-a com alterações da cartilagem articular;
- Quantificar os glicosaminoglicanos da cartilagem articular por técnica histoquímica;
- Quantificar os glicosaminoglicanos da linha epifisial por técnica histoquímica correlacionando com alterações da cartilagem articular;
- Extrair, discriminar e quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados presentes na cartilagem articular por técnica bioquímica;
- Quantificar e detectar o ácido hialurônico da cartilagem articular;
- Avaliar o grau de positividade das fibras colágenas da cartilagem articular, linha epifisial e trabéculas ósseas correlacionando-os com alterações da cartilagem articular

3 - LITERATURA

3.1 - Cartilagem Articular

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado avascular, aneural, alinfático e hipocelular que recobre os ossos das articulações diartrodiais (BULLOUGH, 2004). Sua composição complexa promove uma superfície de suporte, absorção e transferência de carga que permite a movimentação das articulações sem atrito, dissipando parte da carga. Suas células, os condrócitos, são responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

A cartilagem articular é composta basicamente por células e matriz extracelular. O condrócito e seu microambiente pericelular constituem a unidade primária estrutural, funcional e metabólica da cartilagem articular, denominada *chondron*. Fazem parte da matriz extracelular: água, fibras colágenas, proteoglicanos (agrecam) e íons Na^+ e Cl^- . A água é o principal componente do tecido, totalizando 65-80% do peso úmido. As fibras colágenas, principalmente do tipo II, representam de 15 a 22% e os proteoglicanos de 4 a 7% do peso úmido do tecido. Os condrócitos representam menos de 10% desse peso, apenas. (MOW, RATCLIFFE e POOLE, 1992; POOLE, 1997; JACKSON e GU, 2009).

A cartilagem é dividida em quatro zonas com diferentes funções: superficial, intermediária ou transicional, profunda ou radial e zona da cartilagem calcificada. Não existe uma margem bem definida de onde termina uma e começa outra em relação às três zonas mais superficiais.

A zona superficial é a mais fina. É constituída por fibras colágenas com orientação paralela à superfície articular, baixa concentração de proteoglicanos e condrócitos alongados e achatados, paralelos à superfície. Essa zona é a principal responsável pela resistência às forças de tensão e cisalhamento exercidas na cartilagem.

A zona intermediária representa 40-60% da espessura da cartilagem. É formada por proteoglicanos e fibras colágenas mais espessas que da zona superficial, organizadas em camadas radiais. Os condrócitos dessa região têm baixa densidade e forma arredondada.

A zona profunda tem a maior quantidade de proteoglicanos e possui as fibras colágenas mais espessas da cartilagem, sendo estas dispostas radialmente com orientação perpendicular à superfície. Os condrócitos dessa região são esféricos e dispostos em colunas perpendiculares à superfície, também apresentando baixa densidade.

A região da cartilagem calcificada é separada das outras zonas pela *tidemark* e separa a cartilagem hialina do osso subcondral. Sua principal função é ancorar a cartilagem ao osso por meio das fibras colágenas. Os condrócitos dessa região têm um volume menor do que na zona profunda e apresentam-se em pequena quantidade (VENN, 1979; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

A concentração de água e colágeno aumenta em direção à superfície articular, enquanto que a concentração de proteoglicanos aumenta em direção à zona profunda (MOW, RATCLIFFE e POOLE, 1992; JACKSON e GU, 2009).

A matriz extracelular é dividida em três regiões: matriz pericelular, matriz territorial e matriz interterritorial. A matriz pericelular é composta

pelos produtos de síntese dos condrócitos como proteoglicanos e glicoproteínas. A matriz territorial localiza-se imediatamente adjacente a matriz pericelular e contém uma malha densa de fibras colágenas envolvendo as células como um cesto, proporcionando proteção aos condrócitos. A matriz interterritorial compõe a maior parte do volume da cartilagem e tem as fibras colágenas dispostas como arcos góticos, à medida que as mesmas apresentam orientação perpendicular à superfície na zona profunda e orientação paralela a ela na zona superficial (ZAMBRANO *et al.*, 1982; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

A matriz extracelular é constituída por colágeno tipo II (90 - 98%), colágenos tipo VI, IX, X, XI, grandes proteoglicanos, sendo o agregam o principal representante (90%), glicosaminoglicanos (condroitim sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico), pequenos proteoglicanos (decorim, biglycam, fibromodulina) e proteínas não colágeno (ancorina, fibronectina) (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

Os proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas constituídas de um esqueleto protéico ao qual se ligam, covalentemente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos.

Glicosaminoglicanos (GAGs), por sua vez, são heteropolissacarídeos lineares que apresentam como estrutura básica unidades dissacarídicas repetitivas. Essas unidades dissacarídicas são constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e por um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou ainda um açúcar neutro (D-galactose), unidas entre si por ligações glicosídicas. Aos monossacarídeos podem estar esterificados grupos sulfatos, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos, conferem alta densidade de cargas negativas a esses

polímeros. São justamente essas cargas aniônicas que conferem a natureza carregada da matriz extracelular e fazem as cadeias laterais dos glicosaminoglicanos constituintes dos proteoglicanos se repelirem mutuamente mantendo as moléculas em estado de extensão, além de atrair e capturar os dipolos eletropositivos (íons H⁺) da água e o íon sódio que faz com que esse tecido seja extremamente hidrofílico, transformando a matriz extracelular em uma estrutura análoga a uma esponja molecular, conferindo à cartilagem capacidade de resistência às forças de compressão (ROUGHLEY e WHITE, 1980; KJELLÉN e LINDAHL, 1991; LU e MOW, 2008; JACKSON e GU, 2009).

O ácido hialurônico (AH), denominado também *hyaluronan*, é um GAG não sulfatado caracterizado por seu grande comprimento e representa a forma mais precoce evolucionária dos GAGs. Ele é o único GAG que não apresenta sulfatação e que não se encontra covalentemente ligado a um esqueleto protéico formando um proteoglicano. O AH pode interagir com o proteoglicano agregam, formando os agregados de proteoglicanos presentes na cartilagem. A ligação entre o proteoglicano e o AH é estabilizada por uma proteína denominada proteína de ligação. Sua síntese é realizada na membrana plasmática da célula pela *hyaluronan synthase* e sua liberação ocorre diretamente no espaço extracelular onde há a formação dos agregados de proteoglicanos na matriz pericelular. Ainda não se sabe ao certo como os agregados de proteoglicanos se locomovem para as regiões mais remotas da matriz extracelular. A função básica do AH é reter água e regular seu fluxo no tecido. Devido a sua alta viscosidade, o AH contribui atuando como um excelente protetor e lubrificante das articulações. A sua expressão é influenciada por estímulos mecânicos e por outras citocinas. A Interleucina1- β (IL1- β) estimula sua síntese enquanto que o *transforming*

growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) tem ação contrária. O conteúdo de HA na cartilagem articular aumenta com a idade e seu tamanho diminui. Além das funções já conhecidas, suspeita-se também que o AH tenha um papel multifatorial de acordo com seu grau de polimerização, estimulando a inflamação em suas formas de baixo peso molecular e agindo como anti-inflamatório nas formas de alto peso molecular, conforme demonstram alguns estudos com seu uso exógeno (HOLMES, BAYLISS e MUIR, 1988; KAWAKAMI *et al.* 1998; BELL, INGHAM, FISHER, 2006; WANG *et al.* 2006; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008; CAMPO *et al.*, 2010; TANIMOTO *et al.* 2010; JULOVI *et al.*, 2011).

3.2 - Osteoartrose

Para que uma articulação sinovial permaneça saudável, faz-se necessária a presença de uma cartilagem com homeostase balanceada entre os processos de anabolismo e catabolismo. O desequilíbrio entre a síntese e a degradação leva à degeneração (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

A osteoartrose já foi definida antigamente como sendo uma doença isolada da cartilagem, porém atualmente acredita-se que ela é uma doença que afeta a integridade funcional e estrutural da cartilagem, sendo caracterizada pelo processo degenerativo da mesma, como também inflamação da membrana sinovial, alterações peri-articulares e do osso subcondral (GOLDRING e GOLDRING, 2007; GOLDRING e GOLDRING, 2010). Devido a sua peculiar atuação na cartilagem articular, a osteoartrose também pode ser definida como um grupo de doenças da cartilagem articular com a presença simultânea de degradação e reparo da

matriz extracelular, bem como morte, replicação e proliferação de condrócitos (PRITZKER, 2003).

A fisiopatologia da osteoartrose é baseada principalmente no desequilíbrio anabolismo-catabolismo e na capacidade de resposta dos condrócitos como sua proliferação, sua diferenciação em pares de clones ou *clusters* e sua resistência à morte celular ou apoptose. A morte celular ou necrose ocorre sem estímulo fisiológico, sem o gasto de energia e está relacionada com a inflamação havendo uma desintegração do citoplasma e da mitocôndria. A apoptose ocorre com a presença de estímulo, gasto de energia e não está relacionada à inflamação, havendo o encolhimento do citoplasma e a fragmentação nuclear (REES e ALI, 1988; VON DER MARK *et al.*, 1992; POOLE, 1997; KUHN *et al.*, 2004; QUINTAVALLA *et al.*, 2005; NATOLI e ATHANASIOU, 2009; ALMONTE-BECERRIL *et al.*, 2010).

Fazem parte também da fisiopatologia da osteonecrose a atuação das citocinas. A IL1- β e o Fator de Necrose Tumoral-Alpha (TNF- α) atuam diminuindo tanto a síntese dos proteoglicanos como a proliferação dos condrócitos, além de aumentarem a ação de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMP), o óxido nítrico (NO) e a ciclooxigenase 2 (COX-2). As gelatinases (MMP-2, MMP-9) digerem colágeno dos tipos I, II e III, além de quebrar a molécula de fibronectina. As estromelisinases (MMP-3 e MMP-10) quebram a molécula de agregam. O NO é induzido pela *inducible NO synthase* (iNOs) e atua como oxidante celular, diminuindo a síntese da matriz extracelular, aumentando a atividade das MMPs e levando à apoptose celular (STOOP *et al.*, 1999; VAN MEURS *et al.*, 1999; KARSDAL *et al.*, 2008; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

A osteoartrose pode ser dividida em primária, na qual não é identificada uma causa aparente ou secundária, quando é causada por algum fator conhecido, tal como alteração mecânica, inflamatória, metabólica ou outros (BUCKWALTER e MARTIN, 2006; HERRERO-BEAUMONT et al., 2009).

Apesar de a causa da osteoartrose ainda permanecer desconhecida, destacam-se alguns fatores de risco como idade avançada (LOESER, 2009), obesidade (GABAY *et al.*, 2008), hereditariedade (SPECTOR *et al.*, 1996; HERRERO-BEAUMONT *et al.*, 2009) e trauma mecânico da articulação, podendo esse último ser dividido em episódios pontuais de trauma de alta intensidade (HONKONEN, 1995; CIVININI *et al.*, 2009) ou episódios repetitivos de sobrecarga da articulação por estímulo mecânico prolongado (CROFT *et al.*, 1992; FELSON *et al.*, 1991; YOSHIMURA *et al.*, 2000; SCHOUTEN, DE BIE, SWAEN, 2002; BUCKWALTER e MARTIN, 2004) ou em uma articulação deficiente (COHEN *et al.*, 2007). Além das causas mencionadas, a imobilização da articulação também contribui para a degradação da cartilagem (FERRETTI *et al.*, 2005).

A osteoartrose costuma ser investigada por meio de radiografias. As suas características clássicas neste exame são: diminuição do espaço articular, osteófitos, esclerose subcondral e cistos ou geodos. É importantíssimo o entendimento dessa definição quando avaliamos o impacto da realização de exercícios no desenvolvimento da osteoartrose, já que os osteófitos não devem ser considerados, necessariamente, um achado deletério e podem representar uma tentativa de promover estabilidade por parte da articulação. É com base nesta premissa que os osteófitos deveriam ser relevados apenas quando sintomáticos (HUNTER e ECKSTEIN, 2009).

3.3 - Estresse Mecânico e Cartilagem

O estresse mecânico é um regulador dos tecidos musculoesqueléticos e um dos fatores mais importante na manutenção da homeostase das articulações. O estresse mecânico acarreta alterações tróficas nos ossos, músculos, cartilagem articular e tendões, uma vez que a transmissão de cargas mecânicas requer a participação de todos esses elementos, sendo os mesmos sensíveis à magnitude, duração e natureza do estímulo mecânico (MAGNUSSON *et al.*, 2007; BERGMANN *et al.*, 2010; SUN, 2010).

Níveis moderados de estresse mecânico são necessários para manter a integridade da cartilagem. A matriz extracelular da cartilagem está sempre sob tensão durante a carga fisiológica, mesmo na ausência de cargas externas adicionais. Essa tensão cria um estado dinâmico de carga mecânica na interface entre o condrócito e a fibra colágena e na interface entre os condrócitos, que estimula a transdução mecanoquímica. Essa transdução mecanoquímica refere-se à expressão gênica e regulação da síntese protéica celular em resposta aos diferentes estímulos mecânicos que a cartilagem é submetida. O estímulo mecânico fisiológico da cartilagem gera sinais biomecânicos que aumentam o anabolismo dos condrócitos estimulando a produção dos GAGs, do colágeno tipo II e de outros componentes da matriz extracelular, além de diminuir a síntese das MMPs, sendo o advento das culturas de células um passo fundamental para o melhor entendimento dessas relações. (LEE e BADER, 1997; SILVER e BRADICA, 2002; IKENOUE *et al.*, 2003; SHELTON, BADER e LEE, 2003; SEIDEL *et al.*, 2004; SILVER, BRADICA, TRIA, 2004; BLAIN, 2007; KAMIYA *et al.*, 2010; SUN, 2010). A atividade dos condrócitos também é influenciada pelo tipo de carga aos quais são submetidos, sendo a

carga cíclica benéfica e a carga estática deletéria (SHARMA, SAXENA, MISHRA, 2007).

Uma vez que o estresse mecânico moderado faz parte do estímulo fisiológico que mantém a homeostase da articulação, cargas não fisiológicas nos dois extremos (sobrecarga e privação de carga) são deletérias para a cartilagem, estimulando seu catabolismo.

O estresse mecânico excessivo danifica a matriz extracelular e altera o metabolismo dos condrócitos. Diversos estudos foram realizados tentando determinar qual o espectro das cargas não fisiológicas. Ainda que nenhum tenha sido realizado em seres humanos, por razões óbvias, os estudos em animais e com culturas de células começaram a desvendar certos valores e informações importantes, sempre tendo o cuidado de não extrapolar suas conclusões para estudos com seres humanos *in vivo*.

LOENING *et al.* (2000) demonstraram em cartilagem bovina que a apoptose de condrócitos começava a ocorrer com cargas de *peak stress* de 4,5 MPa, aumentando de maneira dose dependente. O aumento da apoptose era máximo 24 horas após o término do protocolo de aplicação de carga. A degradação das fibras colágenas aparecia quando as compressões chegavam a cargas entre 7-12 MPa, contribuindo para esse resultado o fato de que cargas de 13MPa e acima causavam edema do tecido de maneira dose dependente. Os GAGs eram liberados do tecido, também de maneira dose dependente entre 6-13 MPa. Os autores concluíram, portanto, que a compressão excessiva leva à morte celular e alterações da matriz-extracelular, sendo que a apoptose parece ocorrer com cargas de compressão inferiores às necessárias para que comece a ocorrer degradação da matriz. Além do *peak stress*, a taxa de *strain* também é um importante parâmetro envolvido na lesão da cartilagem, conforme demonstraram

KURZ *et al.* (2001) em um estudo com cartilagem bovina onde células submetidas a cargas de 12 MPa (carga sabidamente deletéria conforme apresentado no estudo acima) geradas por uma taxa de *strain* de 0,01/segundo até um *strain* final de 50% não demonstraram alterações mecânicas nem biossintéticas. No entanto, taxas de *strain* de 0,1 e 1/segundo geraram uma carga de 18 e 23 MPa reduzindo a biossíntese de proteínas e a resistência às cargas de compressão e cisalhamento das células. CHEN *et al.* (1999) e CHEN *et al.* (2001) concluíram que a carga repetitiva de 5 MPa a 0,3 Hz leva à lesão das fibras colágenas e morte dos condrócitos, demonstrando o efeito deletério de cargas repetitivas.

Com base nesses trabalhos, conclui-se que valores elevados de *peak stress*, altas taxas de *strain* e cargas repetitivas levam à degeneração da cartilagem (SUN, 2010).

A privação de carga e imobilização também constitui um aspecto do estresse mecânico não fisiológico levando a alterações deletérias da cartilagem como afilamento, amolecimento, diminuição dos proteoglicanos, fibrilação, ulceração e erosão, sendo que a mobilização estimula a recuperação de uma cartilagem lesada (JURVELIN *et al.*, 1986; BEHRENS, KRAFT, OEGEMA 1989; SAAMANEM *et al.*, 1990; HAAPALA *et al.* 1996; HAAPALA *et al.* 1999; HAAPALA *et al.* 2000; FERRETTI *et al.*, 2005; FERRETTI *et al.*, 2006; HAGIWARA *et al.*, 2009; SUN, 2010).

3.3.1 - Exercício Físico Benéfico para Cartilagem e Osteoartrose

Atualmente, é consenso que a prática de exercícios físicos em uma intensidade leve e moderada produz efeitos benéficos na cartilagem, sendo também preconizados como parte do tratamento da osteoartrose.

KIVIRANTA *et al.* (1988) avaliaram os efeitos do exercício moderado na cartilagem articular de cães, concluindo que o mesmo gerou um efeito protetor na cartilagem, aumentando sua espessura e o conteúdo de GAG.

ETTINGER *et al.* (1997) realizaram um ensaio clínico randomizado, com duração de 18 meses, comparando exercícios aeróbicos com exercícios de resistência, em pacientes idosos acima de 60 anos com osteoartrose do joelho evidenciada na radiografia, dor e incapacidade funcional. Concluíram que ambos os tipos de exercício promovem uma melhora modesta da dor, capacidade funcional e desempenho físico.

GALOIS *et al.*, (2004) estudaram os efeitos do exercício dose-dependente em um modelo de indução de osteoartrose em ratos envolvendo a secção do ligamento cruzado anterior. Concluíram que os exercícios leves e moderados produziram um efeito protetor na cartilagem articular, enquanto que os exercícios excessivos acarretaram a perda desse efeito protetor.

TIDERIUS *et al.* (2004) avaliaram indiretamente o conteúdo de GAG da cartilagem articular por meio da ressonância magnética realçada com gadolínio de três grupos diferentes: 12 indivíduos sedentários, 16 indivíduos que praticavam exercícios físicos em média duas vezes por semana e 9 corredores de elite. Concluíram que a cartilagem do joelho humano se adapta ao exercício aumentando seu conteúdo de GAG.

RODDY *et al.* (2005) publicaram um estudo no qual foi desenvolvido um grupo de diretrizes multidisciplinares de profissionais relacionados ao tratamento da osteoartrose. Cada participante descreveu dez pontos principais relacionados ao exercício para tratamento da osteoartrose totalizando 123 recomendações. Após aplicação do processo de Delfos para delimitação dos pontos principais, tendo esse nome baseado no antigo oráculo, chegou-se ao consenso de dez recomendações finais envolvendo o exercício. Cada recomendação foi pesquisada na literatura graduando os trabalhos por qualidade. A evidência de cada recomendação foi avaliada e um consenso final foi deliberado baseado na alocação de duas categorias: força da evidência e força da recomendação. Concluiu-se que existe a recomendação primária de realização de exercício para tratamento da osteoartrose do joelho e quadril. O estudo elucidou claramente quais recomendações são caracterizadas como verdadeiras evidências da literatura e quais são caracterizadas apenas como opinião de especialista.

ROOS e DAHLBERG (2005) avaliaram os efeitos do exercício moderado no conteúdo de GAG da cartilagem articular dos joelhos de pacientes que sofreram meniscectomia 3-5 anos previamente. Quarenta e cinco pacientes foram randomizados em dois grupos: grupo exercícios três vezes por semana por quatro meses e grupo controle, sem exercício. O conteúdo de GAG foi avaliado indiretamente por ressonância magnética realçada com gadolínio. O grupo exercício demonstrou uma melhora do conteúdo articular de GAG em relação ao grupo controle.

MIKESKY *et al.* (2006) publicaram um ensaio clínico controlado randomizado para avaliar os efeitos do exercício de fortalecimento na incidência e progressão da osteoartrose do joelho. Um total de 221 pacientes foi estratificado por sexo, presença de osteoartrose na radiografia

e grau de dor. Foram randomizados em exercícios de fortalecimento e em exercícios de arco de movimento. Após 30 meses de seguimento, os indivíduos do grupo de exercícios de fortalecimento tiveram menor diminuição do espaço articular do joelho na radiografia do que os indivíduos do grupo de exercícios de arco de movimento.

FRANSEN e McCONNELL (2008) realizaram uma revisão sistemática seguindo os princípios da *The Cochrane Collaboration* a respeito do efeito do exercício no solo na osteoartrose do joelho. Dentre os trabalhos analisados, incluíram 32 estudos totalizando 3616 pacientes com dor no joelho e 3719 pacientes com algum grau de disfunção. Concluíram que o exercício no solo tem nível de evidência platina para diminuição da dor e melhora da função, pelo menos por um período curto. O efeito do tratamento pode ser considerado pequeno, porém é comparável ao relatado com anti-inflamatórios não esteróides.

JAMTVEDT *et al.*(2008) procuraram resumir as evidências levantadas por revisões sistemáticas realizadas no período de 2000 a 2007 sobre a fisioterapia nos pacientes com osteoartrose concluindo, com alto nível de evidência, que os exercícios e a perda de peso melhoram a dor e a função nesses pacientes.

LUND *et al.* (2008) realizaram um ensaio clínico controlado, randomizado com 79 pacientes comparando exercícios aquáticos com exercícios no solo em pacientes com osteoartrose. Após três meses de seguimento, somente o grupo de exercícios no solo demonstrou melhora na dor e da força, quando comparado com o grupo controle, enquanto que no grupo de exercícios aquáticos não foi demonstrado nenhum benefício em relação ao controle. Apesar disso, o grupo de exercícios aquáticos teve menos efeitos adversos que o grupo de exercícios no solo.

ZHANG *et al.* (2008) reuniram 16 renomados especialistas de quatro disciplinas médicas (cuidados primários, reumatologia, ortopedia e medicina baseada em evidência) que desenvolveram diretrizes para o tratamento de osteoartrose do quadril e joelho. Como conclusão ficou estabelecido que o melhor tratamento é uma combinação de tratamento farmacológico e não farmacológico. O tratamento não farmacológico consiste em 12 modalidades: educação e cuidados próprios, contato telefônico regular, instrução e assistência com um fisioterapeuta, exercícios aeróbicos como caminhadas, exercícios de fortalecimento muscular e exercícios na água, perda de peso, órtese para auxílio à deambulação, *braces* de joelho, calçados apropriados e palmilhas, modalidades térmicas, estimulação nervosa elétrica transcutânea e acupuntura. O tratamento farmacológico consiste em oito modalidades: acetaminofeno, anti-inflamatórios orais não esteróides inibidores seletivos ou não da COX-2, anti-inflamatórios tópicos e capsaicina, injeções intra-articulares de hialuronatos e corticóides, sulfato de glicosamina e/ou condroitina para alívio dos sintomas, sulfato de glicosamina, sulfato de condroitina e diacereína para possíveis efeitos de modificação estrutural na cartilagem e o uso de analgésicos opióides para o tratamento de dor refratária. Dentre as opções cirúrgicas, são citados cinco tipos: prótese total do quadril e/ou joelho, prótese unicompartmental do joelho, osteotomia e procedimentos de preservação da articulação, lavagem articular e desbridamento artroscópico na osteoartrose do joelho e artrodese como procedimento de salvação na falha da prótese. Ressaltando a importância de exercícios regulares, incluindo exercícios aeróbicos, caminhadas e fortalecimento muscular do quadríceps realizado em casa, os autores citam que essas são recomendações contidas em 21 das 21 diretrizes publicadas analisadas por eles.

BOSOMWORTH (2009), após debater e realizar uma extensa revisão da literatura, termina concluindo que o exercício moderado gera efeitos benéficos nos pacientes com osteoartrose.

HELMARK *et al.* (2011) realizaram um estudo em humanos que avaliou os efeitos agudos do exercício de carga tipo *leg press* sobre marcadores de *turnover* da cartilagem: COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*), agregam, peptídeo C-terminal de colágeno II e interleucina-6 . A dosagem desses marcadores era realizada antes do exercício e após 30 minutos do mesmo. Os marcadores foram avaliados na urina, sangue e líquido sinovial. A única alteração foi um decréscimo significativo na concentração do marcador de COMP no líquido sinovial, enquanto que os marcadores de agregam não apresentaram diferença significativa, demonstrando assim que o exercício moderado atua de forma aguda diminuindo parte do processo de degeneração da cartilagem.

Com base nesses inúmeros trabalhos, sendo muitos deles meios importantes de análise de literatura, como as revisões sistemáticas que agruparam um sem número de resultados das publicações analisadas, podemos afirmar que os exercícios de intensidade leve e moderada são benéficos para a cartilagem, tanto saudável como quando acometida pela osteoartrose, sendo consenso sua recomendação no tratamento dessa doença.

3.3.2 - Exercício Físico Excessivo Sem Relação com Osteoartrose

Vários estudos não demonstraram relação entre o nível de atividade física e o desenvolvimento da osteoartrose.

SOHN e MICHELI (1985) não encontraram associação entre a corrida de longa distância e osteoartrose, assim como PANUSH *et al.* (1986) que compararam 17 homens corredores (que corriam em média 44,8km por semana) com 18 homens não corredores. Os dois grupos foram acompanhados por 12 anos. Não houve diferença quanto à prevalência de dor, nem quanto à prevalência de evidências radiográficas de osteoartrose.

HANNAN *et al.* (1993) avaliaram o fator de risco potencial de osteoartrose do joelho ao se realizar atividade física regular durante a meia-idade. O estudo foi realizado nos últimos anos na famosa coorte de *Framingham*. Radiografias com carga do joelho foram solicitadas em 1983-85 para os 1415 indivíduos com idade média de 75 anos. Esses mesmos indivíduos foram questionados em 1954-57 e 1971-73 sobre o número de horas gasto por dia em atividades físicas de diferentes níveis, variando desde o sedentarismo até atividades físicas pesadas. Não houve associação entre o nível de atividade física e a presença de osteoartrose após ser realizado o ajuste para idade, índice de massa corpórea, lesão do joelho, tabagismo e nível de ensino. Os autores ressaltam a elevada incidência de osteófitos assintomáticos em homens com alto nível de atividade física, sugerindo que a atividade física habitual pode influenciar o aparecimento de osteófitos, mas não a osteoartrose mais grave. Em resumo, a atividade física regular não elevou o risco de desenvolver osteoartrose do joelho.

LANE *et al.* (1993) conduziram um estudo longitudinal com cinco anos de duração. Nesse trabalho constatou-se que a corrida não acelerou o desenvolvimento de osteoartrose clínica ou radiográfica do joelho, sendo que com o envelhecimento 12% dos corredores, assim como também 12%

do grupo controle composto por não corredores, apresentaram osteoartrose do joelho.

LANE *et al.* (1998), novamente, em um estudo longitudinal com nove anos de duração, aumentando o seguimento dos pacientes estudados previamente, demonstrou que a presença radiográfica de osteoartrose do quadril e a progressão radiográfica da osteoartrose do joelho foi semelhante nos corredores e não corredores.

BUCKWALTER e MARTIN (2004) realizaram um estudo buscando avaliar o risco de osteoartrose nos praticantes de esporte, concluindo que as modalidades sem carga de impacto e torcional excessivas, em indivíduos com articulações normais juntamente com função neuromuscular adequada, podem levar à formação de osteófitos, porém esse achado tem pouco ou nenhum efeito no risco de desenvolver osteoartrose. Em contrapartida, modalidades com carga de impacto e torcional excessivas aumentam o risco de desenvolver osteoartrose secundária pós-traumática. Pessoas com anatomia ou alinhamento alterados, lesão prévia da articulação ou cirurgia, osteoartrose, instabilidade articular, incongruência articular ou displasia, distúrbios neuromusculares ou força inadequada, apresentam risco aumentado de lesão articular quando participam de esportes. Resumindo, para se obter os benefícios da prática de exercício físico com atividades esportivas sem aumentar o risco de osteoartrose, é necessário o entendimento das relações entre a participação esportiva e as lesões articulares e entre as lesões articulares e a degeneração articular. Desta forma, pessoas que desejam praticar esportes devem ter uma avaliação da sua estrutura articular, função, força muscular e atividade neuromuscular. Indivíduos com histórico de lesão articular ou osteoartrose leve devem optar por esportes com baixo risco de desenvolver osteoartrose.

CYMET e SINKOV (2006) concluem que corridas de longa distância não parecem ser um fator de risco para osteoartrose em indivíduos saudáveis sem contra-indicações para tal prática, além de apresentarem um efeito protetor na articulação, porém os autores recomendam a realização de mais estudos relacionados ao assunto.

CHAKRAVARTY *et al.* (2008), em um recente estudo prospectivo, avaliaram 45 pacientes corredores de longa distância e 53 controles com idade média de 58 anos. Os pacientes foram acompanhados de 1984 a 2002 com radiografias seriadas. Apesar de os corredores terem uma maior prevalência de artrose e pior graduação radiográfica no início do estudo, ao final, comparando-se com os controles, não houve diferença quanto ao grau de artrose e necessidade de cirurgia.

HUNTER e ECKSTEIN (2009) concluem que na ausência de lesões articulares não existe evidência para endossar o conceito errôneo que o exercício é prejudicial às articulações. Ao contrário, parece que o exercício tem um efeito benéfico, além das outras vantagens já comprovadas para a saúde geral (STEPHENSON *et al.*, 2000; TANASESCU *et al.*, 2002; SIGAL *et al.*, 2004).

Conforme evidenciado nos trabalhos expostos acima, a prática de exercícios físicos excessivos não teve relação com a osteoartrose.

3.3.3 - Exercício Físico Excessivo Relacionado à Osteoartrose

Alguns trabalhos apresentados na literatura demonstraram um aumento na incidência ou no risco de osteoartrose com a prática de

atividades físicas mais intensas, seja envolvendo alta carga de impacto ou envolvendo alta carga torcional.

KUJALA *et al.* (1995) estudaram a relação entre diferentes condições de atividades físicas envolvendo carga e osteoartrose do joelho. Selecionaram 117 atletas de elite homens (idade de 45-68 anos) de diferentes modalidades: 28 corredores de longa distância, 31 jogadores de futebol, 29 levantadores de peso e 29 atiradores. A prevalência de osteoartrose patelofemoral ou femorotibial foi de 3% nos atiradores, 29% nos jogadores de futebol, 31% nos levantadores de peso e 14% nos corredores. Jogadores de futebol tiveram a maior prevalência de osteoartrose femorotibial (26%) e levantadores de peso tiveram a maior prevalência de osteoartrose patelofemoral (28%). Como conclusão, jogadores de futebol e levantadores de peso têm um risco mais elevado de desenvolver osteoartrose do joelho, diferentemente dos corredores, mesmo esses sendo de elite. O risco elevado pode ser explicado em parte pelas lesões no joelho dos jogadores de futebol e pelo alto índice de massa corpórea nos levantadores de peso.

SPECTOR *et al.* (1996) realizaram um estudo de coorte retrospectivo com 81 mulheres ex-atletas de elite (67 corredoras de meia e longa distância e 14 tenistas) com idades entre 40-65 anos comparadas com 977 controles (mulheres de mesma idade). Foi concluído que mulheres esportistas têm um risco duas a três vezes maior de ter osteoartrose na radiografia (particularmente osteófitos) dos quadris e joelhos. O risco foi semelhante em ex-atletas de elite e no subgrupo da população geral, que relatou ter praticado esportes por muito tempo, sugerindo que a duração é mais importante que a frequência dos treinos.

TEITZ e KILCOYNE (1998) avaliaram a prevalência de osteoartrose em dançarinos. Quatorze dançarinos aposentados com idades entre 27 e 46 anos, que praticaram dança por pelo menos 10 anos, foram incluídos nesse estudo e comparados com 36 indivíduos pareados por idade não dançarinos. A prevalência de artrose nos joelhos, tornozelos, e primeira articulação metatarsofalângica foi maior nos dançarinos do que nos controles de mesma idade.

McALINDON *et al.* (1999) estudaram a relação entre o nível de atividade física e o risco de osteoartrose no idoso. Utilizaram participantes do famoso estudo de coorte de *Framingham* que possuíam radiografias do joelho sem alteração no exame do biênio 18 (1983-1985) e que responderam ao questionário de atividade física no exame 20 (1988-1989). O seguimento das radiografias do joelho foi realizado no exame do biênio 22 (1992-1993). O desfecho do estudo era o aparecimento de osteoartrose do joelho radiográfica ou sintomática durante o seguimento. O número de horas de atividade física pesada por dia foi associado ao risco de desenvolver osteoartrose radiográfica (*odds ratio* 1,3 por hora), sendo esse risco mais elevado em obesos. Como conclusão, os autores relatam que a atividade física pesada é um importante fator de risco para o desenvolvimento de osteoartrose do joelho no idoso, especialmente em indivíduos obesos. Atividade física leve e moderada não parece aumentar o risco.

CHENG *et al.* (2000) realizaram um estudo prospectivo avaliando a atividade física regular e o diagnóstico de osteoartrose do quadril e/ou joelho. Avaliaram 16961 pessoas com idade entre 20-87 anos entre os anos de 1970 e 1995. Níveis de atividade física elevados (correr 20 ou mais milhas por semana) foram associados com osteoartrose em homens abaixo

dos 50 anos, porém não houve nenhuma relação nas mulheres abaixo dos 50 anos, nem nos pacientes mais velhos (acima de 50 anos, homens e mulheres).

Conforme pudemos evidenciar, alguns estudos da literatura demonstram de fato uma correlação entre exercício excessivo e osteoartrose.

3.4 - Métodos de Avaliação da Cartilagem

Diversos métodos de avaliação da cartilagem foram propostos ao longo dos anos, de forma que a miríade de protocolos preencheria diversos compêndios numa tentativa de avaliá-los e descrevê-los. Dentre os estudos publicados, a recente revisão realizada por RUTGERS *et al.*, (2010) apresenta-se como um guia, após analisar diferentes tipos de classificações histológicas e metodologias de estudo dos elementos da cartilagem. Das classificações histológicas de osteoartrose validadas apresentadas tanto para seres humanos como para animais, o estudo destaca a utilização do sistema de Mankin ou HHGS- *Histological-Histochemical Grading System* e da classificação OARSI - *Osteoarthritis Research Society International* (MANKIN *et al.*, 1971, PRITZKER *et al.* 2006).

O sistema de Mankin avalia a estrutura da cartilagem, celularidade, coloração com safranina-0 e a integridade da *tidemark* como subitens separados. A soma das graduações dos subitens varia de 0 (normal) a 14 (osteoartrose grave). Apesar de muito utilizada, existem críticas quanto a sua reprodutibilidade e parâmetros inadequados para avaliação da osteoartrose nos graus leve e moderado, além do acesso inadequado

relativo à extensão da lesão (MANKIN *et al.*, 1971; RUTGERS *et al.*, 2010).

A classificação OARSI enfatiza a extensão da lesão da cartilagem através da graduação em graus, estágios e escores. O grau é definido de acordo com a profundidade ou extensão vertical acometida. São 6 graus progressivos evoluindo de 1 em 1, que podem ser subdivididos em outros 5 subgraus evoluindo de 0.5 em 0.5 a partir do grau 1 quando se deseja avaliar alterações mais sutis ou realizar uma classificação mais completa. A caracterização como grau 0 é atribuída aos cortes com cartilagem normal, grau 1 quando há a presença marcante dos pares de clones de condrócitos, grau 1.5 quando há a presença marcante de células com aspecto irregular que denotam morte celular (encolhimento da célula, aspecto de lacunas vazias e núcleo picnótico). Até esse grau a superfície da cartilagem deve estar intacta. Do grau 2 em diante os cortes já devem apresentar descontinuidade da superfície, sendo o grau 2 classificado na presença de fissuras verticais da zona superficial da cartilagem articular. No grau 3 as fissuras verticais já atingem a zona intermediária. O grau 4 é atribuído na presença de erosão com perda de matriz da zona superficial e intermediária. No grau 5 já existe o desnudamento do osso subcondral e no grau 6 ocorre a deformação com remodelamento ósseo e micro fraturas com tecido de reparo fibrocartilaginoso e ósseo. O estágio é definido de acordo com a extensão horizontal acometida. São 4 estágios que podem ser usados em conjunto ou separadamente com os graus, evoluindo segundo a área horizontal acometida: estágio 1 representa menos de 10%, estágio 2 entre 10% e 25%, estágio 3 entre 25% e 50% e estágio 4 com mais de 50%. O escore é a avaliação combinada do grau (severidade) e do estágio

(extensão) multiplicando-se os dois índices (PRITZKER *et al.*, 2006; RUTGERS *et al.*, 2010).

A avaliação dos GAGs da cartilagem articular pode ser realizada de várias maneiras. Dentre as técnicas que quantificam a intensidade de coloração imunoistoquímica, podemos citar os métodos de HAIGH e SCOTT (1986) e KLEIN *et al.* (2001) que possibilitam uma análise semi-quantitativa ou ainda uma aprimoração dessa técnica, utilizando um método assistido por computador que possibilita a quantificação dos elementos, aumentando a sensibilidade da análise imunoistoquímica conforme demonstram MATOS *et al.*, (2006) através de uma análise quantitativa digital. Também avaliando os GAGs encontramos a análise eletroforética de SCOTT *et al.*, (1994) aprimorada pela β -eliminação proposta por CARLSON, 1968 como melhora da degradação enzimática. Através da eletroforese, é possível a distinção dos GAGs sulfatados, conforme demonstra DIETRICH e DIETRICH (1976) e sua quantificação por densitometria.

A quantificação do ácido hialurônico pode ser feita por meio de um ensaio fluorimétrico não competitivo tipo ELISA desenvolvido no Departamento de Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (EPM - UNIFESP) (MARTINS *et al.*, 2003).

A avaliação do colágeno, mesmo quando realizada com microscopia de luz polarizada é sujeita a erros por ser uma técnica difícil e exigente. A análise é realizada de forma semi-quantitativa e pode ser executada por meio da microscopia de luz (RIEPPPO *et al.*, 2008).

3.5 - Protocolos de Treinamento Animal

A literatura descreve vários modelos animais para estudo da cartilagem. Inicialmente esses modelos foram desenvolvidos para o estudo da fisiopatologia da osteoartrose e para o estudo de novas drogas para o tratamento dessa doença. Entende-se a importância do estudo com animais, visto que antes de uma nova substância ser introduzida em ensaio clínicos para tratamento da osteoartrose, ela deve ser avaliada quanto à repercussão nos tecidos alvos e seus efeitos colaterais em outros órgãos, sua segurança e sua eficácia, sendo essa parte do estudo realizada em modelos pré-clínicos através de estudos experimentais com animais. Dentre as espécies mais utilizadas, destacam-se, entre as de pequeno porte, os camundongos, os ratos e os porquinhos da índia, já, entre as de grande porte, os coelhos, os porcos, os cachorros, as ovelhas e os cavalos (PASTOUREAU, HUNZIKER, PELLETIER, 2010; POOLE *et al.*, 2010; SCHMITZ *et al.*, 2010). A maioria dos modelos de protocolos de indução de osteoartrose em animais foi desenvolvida no fim da década de 70 (EHRlich *et al.*, 1975; SHOJI *et al.*, 1978; SCHWARTZ e GREENWALD, 1979-1980), com exceção de THAXTER, MANN, ANDERSON (1965) que foram mais precoces.

Os animais de grande porte têm a vantagem de oferecerem grande quantidade de tecido para estudo, porém apresentam um custo mais elevado envolvendo, por exemplo, o espaço para acomodação, a manutenção e as quantidades maiores das substâncias utilizadas no experimento. Os animais de pequeno porte, em contrapartida, têm um menor custo e normalmente mais fácil manuseio. Os ratos e camundongos são particularmente promissores devido ao mapeamento avançado já existente de seu genoma e

as similaridades marcantes com humanos de sua genética, anatomia e fisiologia (LINDBLAD-TOH, 2004). Os ratos, apesar de seu pequeno porte, são maiores do que os camundongos e conseqüentemente oferecem mais tecido para estudo. A osteoartrose espontânea no rato é extremamente rara (SMALE, BENDELE, HORTON, 1995). Vários protocolos de indução de osteoartrose em ratos foram desenvolvidos.

PAP *et al.* (1998) realizaram um estudo clássico com ratos, tentando superar a crítica de que os modelos animais fisiológicos de corrida vigentes na época não tinham conseguido demonstrar sinais evidentes de osteoartrose por falta de motivação dos animais ou por fadiga dos mesmos conforme demonstraram KIVIRANTA *et al.* (1992), AROKOSKI *et al.* (1993), AROKOSKI *et al.* (1994), SÄÄMÄMEN *et al.* (1994), AROKOSKI *et al.* (1996) em estudos de corrida excessiva na esteira utilizando cães. Esses estudos demonstraram apenas as alterações mais sutis presentes nos graus iniciais da doença como depleção localizada do GAG da cartilagem articular nas regiões de maior carga e diminuição da birrefringência do colágeno na zona superficial. Para tentar superar tal obstáculo, PAP *et al.* (1998) desenvolveram um mecanismo de estimulação elétrica intra-craniana por meio da implantação de um eletrodo na área de recompensa do cérebro. O treinamento em si constituía-se na corrida de 500m/dia, durante cinco dias por semana. Dividiram o estudo em três grupos, sendo um controle que nada correu, outro que correu 15 km em seis semanas e outro que correu 30 km em doze semanas. Utilizando a escala de avaliação histológica de Mankin, classificaram os ratos que correram 15 km e os ratos que correram 30 km como tendo grau leve e grau moderado de osteoartrose, respectivamente. Os ratos do grupo que nada correu não tiveram osteoartrose.

Esse protocolo de treinamento desenvolvido por PAP *et al.* (1998) tem sido utilizado mais recentemente trocando a estimulação elétrica intracraniana por um gerador de choque elétrico acoplado à esteira que descarrega pequenas descargas aos animais ociosos que ficarem parados na parte de trás da mesma, sendo estudados grupos de ratos que correm até 30 km em seis semanas (TANG *et al.*, 2008; SEKIYA *et al.*, 2009).

Outro protocolo de indução de osteoartrose em ratos envolve a realização cirúrgica de uma lesão no menisco medial, amplamente utilizada na literatura (JANUSZ *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2005; WANCKET *et al.*, 2005; BOVE *et al.*, 2006; REZENDE *et al.*, 2006; FLANNERY *et al.*, 2009; CHOCKALINGAM *et al.*, 2011).

A secção do ligamento cruzado anterior, associada ou não à meniscectomia medial parcial também se apresenta em uma grande quantidade de estudos (WILLIAMS *et al.*, 1982; STOOP *et al.*, 2000; KARAHAN *et al.*, 2001; GALOIS *et al.*, (2004); HAYAMI *et al.*, 2006; APPLETON *et al.*, 2007; JEAN *et al.*, 2007; YORIMITSU *et al.*, 2008).

Além dos modelos propostos, também existe a indução de osteoartrose em ratos pela injeção intra-articular de um agente químico ou enzima (GUINGANP *et al.*, 1997; GUZMAN *et al.*, 2003; JANUSZ *et al.*, 2004; KALBHEN, 2006; LIN, HUANG, CHAI, 2006; YEH *et al.*, 2008; BARAGI *et al.*, 2009; KALFF *et al.*, 2010).

Conforme evidenciado, diversos estudos com animais foram e ainda são utilizados para a melhor compreensão da relação entre o estresse mecânico e a cartilagem, da osteoartrose e de novas drogas terapêuticas, entre outras finalidades.

4 – MÉTODOS

4.1 - Animal de Experimentação

Para a realização deste trabalho, que consistiu em um estudo experimental, foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia*, *Mammalia*), adultos, com idade entre 15 e 20 semanas de vida, pesando entre 200 e 280g no início dos experimentos. Os animais utilizados foram adquiridos no biotério CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais) da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (EPM - UNIFESP) e mantidos no biotério do laboratório de Fisiologia Renal durante o período experimental. Os animais foram alojados em grupos de até quatro ratos, em gaiolas apropriadas, onde tiveram livre acesso a água e comida. As condições do biotério obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 07:00-19:00 horas), sendo a temperatura ambiente mantida constante entre 21 e 22°C.

Os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da EPM – UNIFESP foram estritamente observados. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo sob o número 0302/08.

4.2 - Equipamento

A familiarização com o ergômetro, determinação da treinabilidade e o programa de treinamento físico foram realizados em esteira rolante modelo AVS com um gerador de choque elétrico de 0-500 V ativado quando o animal permanece parado na parte traseira da esteira causando pequenos choques de 2mA, possuindo capacidade entre 0 e 5mA (AVS projetos São Paulo - Brasil, Figura 1).



Figura 1 – Treinamento dos ratos em esteira rolante modelo AVS (AVS projetos São Paulo – Brasil)

4.3 – Critérios Treinabilidade

Para determinar uma medida de treinabilidade dos animais, foi aplicada uma escala de desempenho na esteira (Figura 1), classificada por Dishman *et al.* (1988) de 1 a 5 como se segue: 1= animal que se recusou a correr, 2= corrida sem constância (correu e parou ou correu em direção errada), 3= corrida regular, 4= corrida boa (ocasionalmente correu na parte de trás da esteira), 5= corrida excelente (correu permanentemente na parte da frente da esteira). Os animais com uma classificação de 3 ou mais foram incluídos no estudo. Este procedimento foi usado para excluir possíveis níveis diferentes de estresse entre os animais.

4.4 – Procedimento Experimental

Foram utilizados 24 ratos machos albinos da linhagem *Wistar*, adultos, com idade entre 15 e 20 semanas de vida, pesando entre 200 e 280g no início dos experimentos.

Os animais foram familiarizados com a esteira rolante (Figura 1), por três dias consecutivos, correndo a uma velocidade de 10 m/min durante 10 minutos por dia sem inclinação. A esteira tinha um gerador de choque elétrico que estimulava os animais a continuarem correndo, uma vez que quando permaneciam parados na parte de trás recebiam pequenas descargas elétricas. Os animais selecionados foram divididos em dois grupos: grupo treinado (GT) e grupo controle (GC). Os animais do GC permaneceram sem realizar mais corridas após a familiarização com a esteira rolante. Os animais do GT foram submetidos a um treinamento

progressivo de corrida cinco dias por semana durante 12 semanas. Não foi aplicada inclinação na esteira. Para produzir adaptação ao treinamento, a velocidade de corrida e a duração das sessões foram corrigidas semanalmente de forma alternada. A velocidade foi corrigida em 5 m/min e a duração em 10 min. O treinamento desenvolveu-se com duração inicial de 10 minutos, a uma velocidade de 10 m/min. A duração das sessões era aumentada em 10 minutos a cada duas semanas com o primeiro aumento acontecendo na segunda semana. A velocidade de corrida foi corrigida em 5 m/min a cada duas semanas com o primeiro aumento acontecendo na terceira semana, progredindo gradualmente até pelo menos 25 m/min ao redor da nona semana.

Para determinar a intensidade relativa de treinamento foram realizados testes de velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) a cada 30 dias em quatro momentos distintos: antes do início da primeira semana de treino, ao término da quarta semana, ao término da oitava semana e ao término da décima segunda semana. Esses testes foram aplicados buscando-se manter a intensidade de treinamento sempre próxima de 60% da $V_{m\acute{a}x}$ corrigindo-se as intensidades à medida que os animais se adaptavam a progressão do treino. Foi utilizada a $V_{m\acute{a}x}$ com base em sua relação direta com o consumo de oxigênio (VO_2 máximo). Segundo AOKI, BELMONTE E SEELAENDER (2003), a $V_{m\acute{a}x}$ suportada pelo animal corresponde a 100% do VO_2 máximo. Portanto, se a intensidade de treino desejada for de 60% do VO_2 máximo, isto corresponderá a 60% da $V_{m\acute{a}x}$.

O teste de $V_{m\acute{a}x}$ consistiu de corrida em esteira onde a velocidade inicial foi de 10 m/min. A cada três minutos, a velocidade foi aumentada a uma taxa de 2 m/min até a exaustão. A velocidade máxima registrada

após o teste foi aquela sustentada pelo período de três minutos que precedeu a exaustão. A condição de exaustão foi determinada quando o animal não mais conseguia se manter na dianteira da esteira, apesar dos estímulos produzidos pela grade de choque. O teste era interrompido após o animal ter recebido dez estímulos em um período inferior a um minuto.

Ao final das 12 semanas de treinamento, os animais do GT, que correram em torno de 55 km, foram submetidos a um exercício de *ultra-endurance* em esteira a uma intensidade que correspondeu a 60% da $V_{m\acute{a}x}$ até a exaustão. Passadas 12 semanas, os animais de ambos os grupos foram sacrificados, sendo os do GT sacrificados logo após o exercício final de *ultra-endurance*. Os animais foram sacrificados por decapitação após sedação.

Extraiu-se o fêmur direito e esquerdo juntamente com os joelhos dos ratos com instrumental cirúrgico seccionando logo abaixo do quadril e do joelho. Posteriormente isolamos o fêmur distal, tomando-se o cuidado de não danificar a cartilagem ao realizar a separação do fêmur da tíbia. Os músculos, tendões, ligamentos, meniscos e a cápsula articular foram cuidadosamente removidos. O fêmur direito foi fixado em solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e encaminhado para o Departamento de Histologia da EPM - UNIFESP. O fêmur esquerdo foi lavado em tampão fosfato salino (PBS) e mantido por duas horas em paraformaldeído 2% a temperatura ambiente, sendo encaminhado e armazenado em PBS na geladeira do Departamento de Biologia Molecular da EPM - UNIFESP.

4.5 – Preparo do Material Histológico

As amostras de fêmur direito com as respectivas cartilagens articulares foram fixadas em solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, descalcificadas em ácido fórmico 25%, pH 2,0, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados com 5 μ m de espessura, no sentido coronal e aderidos a lâminas de vidro.

As amostras de fêmur esquerdo foram lavadas no PBS e mantidas por duas horas em paraformaldeído 2% a temperatura ambiente, sendo posteriormente encaminhadas e armazenadas em PBS na geladeira.

4.6 – Análise Histomorfológica

Para a histomorfometria, após coloração com Hematoxilina de Carazzi e Eosina de Lison (H.E.), alguns cortes dos CG e GT, foram submetidos ao processo de captação de imagem e avaliação histomorfométrica através do sistema digital de processamento e análise composto por um microscópio *Olympus* BX 40, com objetivas planacromáticas, acoplado a uma vídeocâmera modelo *Sony* CCD – IRIS, contendo placa digitalizadora de imagem e o programa para fotografar *AxionVision 4.2 REL (Carl Zeiss)*, instalado em um microcomputador no Laboratório do Departamento de Morfologia e Genética, disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, da EPM - UNIFESP.

Para contagem do número de condrócitos das zonas superficial, intermediária e profunda da cartilagem articular nas áreas de carga e não

carga dos grupos controle e treinado, as imagens foram capturadas com lente objetiva de 10x. Padronizou-se um retângulo com área aproximada 10000 μm^2 e este foi colocado em três regiões diferentes da cartilagem articular, conforme ilustra a Figura 2:

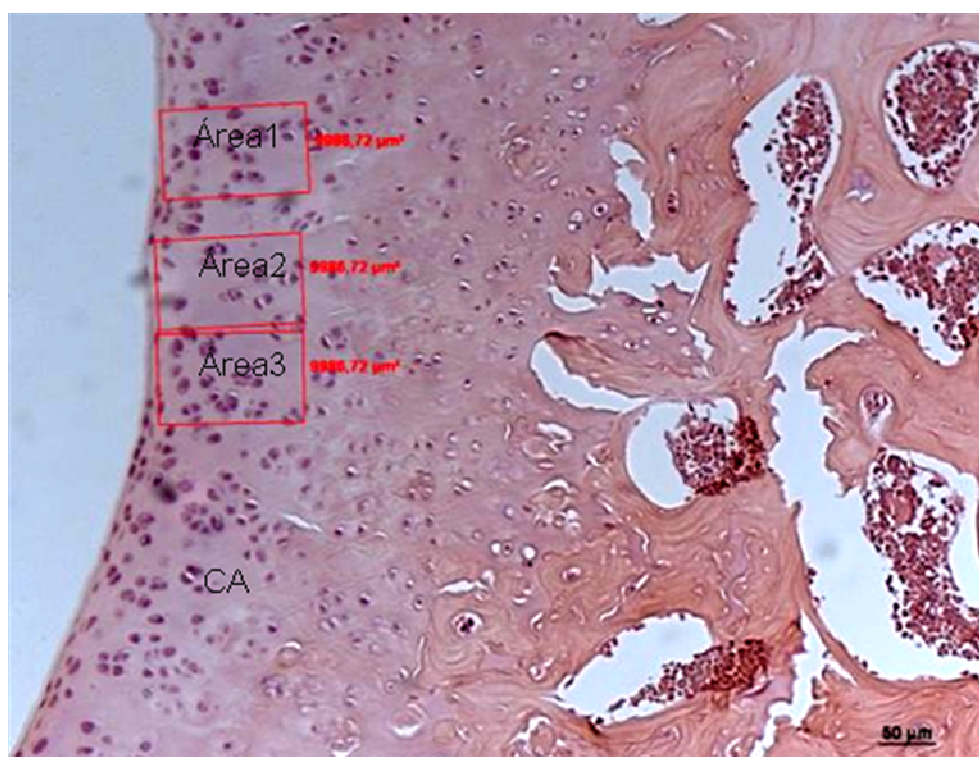


Figura 2 – Fotomicrografia da cartilagem articular (CA), com representações de áreas das zonas superficial e intermediária para a contagem de condrócitos. Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento 10x.

O espaço delimitado por cada retângulo foi chamado de área, dessa forma, para cada corte histológico temos: área 1, área 2 e área 3, todos em escalas de μm^2 . A contagem do número de condrócitos foi realizada apenas para os condrócitos que ficaram delimitados dentro de cada área.

Posteriormente, calculou-se a média do número de condrócitos em cada corte histológico.

A contagem dos pares de clones de condrócitos foi efetuada nas áreas 1, 2 e 3 pré-estabelecidas das zonas superficial e intermediária para a contagem de condrócitos. Na seqüência calculou-se a média do número de condrócitos em cada corte histológico.

Por meio da classificação histológica de osteoartrose da *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI), os cortes histológicos foram distinguidos em diferentes graus. A caracterização como grau 0 é atribuída aos cortes com cartilagem normal, grau 1 quando há a presença marcante dos pares de clones de condrócitos, grau 1.5 quando há a presença marcante de células com aspecto irregular que denotam morte celular (encolhimento da célula, aspecto de lacunas vazias e núcleo picnótico). Até esse grau a superfície da cartilagem deve estar intacta. Do grau 2 em diante os cortes já devem apresentar descontinuidade da superfície, sendo o grau 2 classificado na presença de fissuras verticais da zona superficial da cartilagem articular. No grau 3 as fissuras verticais já atingem a zona intermediária. O grau 4 é atribuído na presença de erosão com perda de matriz da zona superficial e intermediária. No grau 5 já existe o desnudamento do osso subcondral e no grau 6 ocorre a deformação com remodelamento ósseo e microfraturas com tecido de reparo fibrocartilaginoso e ósseo.

A análise da espessura da cartilagem articular foi realizada a partir de imagens capturadas com uma lente objetiva de 2,5x. Para determinar e padronizar o ponto exato para a realização das medidas nos vários cortes histológicos examinados foi traçada uma reta entre o vértice da linha epifisial, denominado ponto A e o ponto mais profundo da

cartilagem articular denominado ponto D. A partir do prolongamento dessa reta, a distância do ponto D até o ponto mais superficial da cartilagem articular constitui-se na espessura da cartilagem articular (Figura 3).

Para análise da espessura da linha epifisial, três regiões em cada corte histológico foram analisadas e posteriormente calculada a média.

Selecionou-se o ponto central do vértice da linha epifisial, ponto A e a partir dele traçou-se duas retas de mesmo comprimento (aproximadamente $820\mu\text{m}$) encontrando-se os pontos B e C, sendo a distância AB igual à distância BC com os pontos B e C aproximadamente no ponto médio da espessura da linha epifisial. Com isso padronizou-se a mensuração da espessura da linha epifisial na mesma altura dos diferentes cortes histológicos. Em cada ponto mensurou-se a espessura da linha epifisial conforme ilustra a Figura 3.



Figura 3 - Fotomicrografia demonstrando as medidas histomorfométricas para análise de espessura da cartilagem articular (CA) e linha epifisial (LE). Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento 2,5x

4.7- Técnica Histoquímica *Alcian Blue* pH 0,5

Cortes histológicos de amostras do fêmur direito foram submetidos à técnica histoquímica de *Alcian Blue*, preparado em pH 0,5, que evidencia somente os glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados. Nesse pH, o radical carboxila dos GAGs não sulfatados, como o ácido hialurônico, não ioniza-se, pois um meio rico em H⁺ neutraliza esse radical, impedindo de reagir com o corante.

Para tanto, os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em etanol e lavados rapidamente em água corrente. A seguir, foram submersos no ácido clorídrico (HCl) 0,5N por 2 minutos e posteriormente submetidos à solução de *Alcian Blue* pH 0,5 por 15 minutos. Após, foi retirado todo o excesso da solução com ajuda de papel filtro, deixando por mais 2 minutos em HCl 0,5N e lavando em água corrente.

Todas as lâminas foram fotografadas, por um microscópio de luz *Axiolab Standard 20 (Carl Zeiss)*, com objetivas planacromáticas, acoplado a uma videocâmera modelo *Sony CCD – IRIS*. As imagens foram capturadas com objetivas de 40x, onde foi padronizada a região da cartilagem articular no ponto D, e da linha epifisial no ponto A para os cálculos qualitativos (Figura 3).

Por meio do sistema *ImageLab 2000 (Softium Informática Ltda., Brasil)*, um software de análise de imagens que permite o processamento e o cálculo de vários parâmetros de estruturas não geométricas em imagens digitalizadas, foram avaliadas sempre áreas da cartilagem articular e da linha epifisial com a mesma dimensão. A densidade ótica

média dessas áreas era automaticamente calculada e representava a média da composição das cores vermelho, verde e azul (RGB) por área analisada. A cor branca absoluta corresponde à densidade óptica máxima e é composta pela soma total de vermelho, verde e azul, enquanto que a cor preta é a ausência dessas cores.

Dessa maneira o programa calcula a densidade óptica criando uma escala decrescente em que os valores mais altos correspondem às cores que são visualmente bem definidas. É fornecido ao sistema o padrão de cor a ser quantificada. O sistema identifica a cor, preenche a área evidenciada pelo *Alcian Blue* (tons de azul) na região estudada e realiza a quantificação, sendo os resultados expressos em porcentagem (Figura 4).

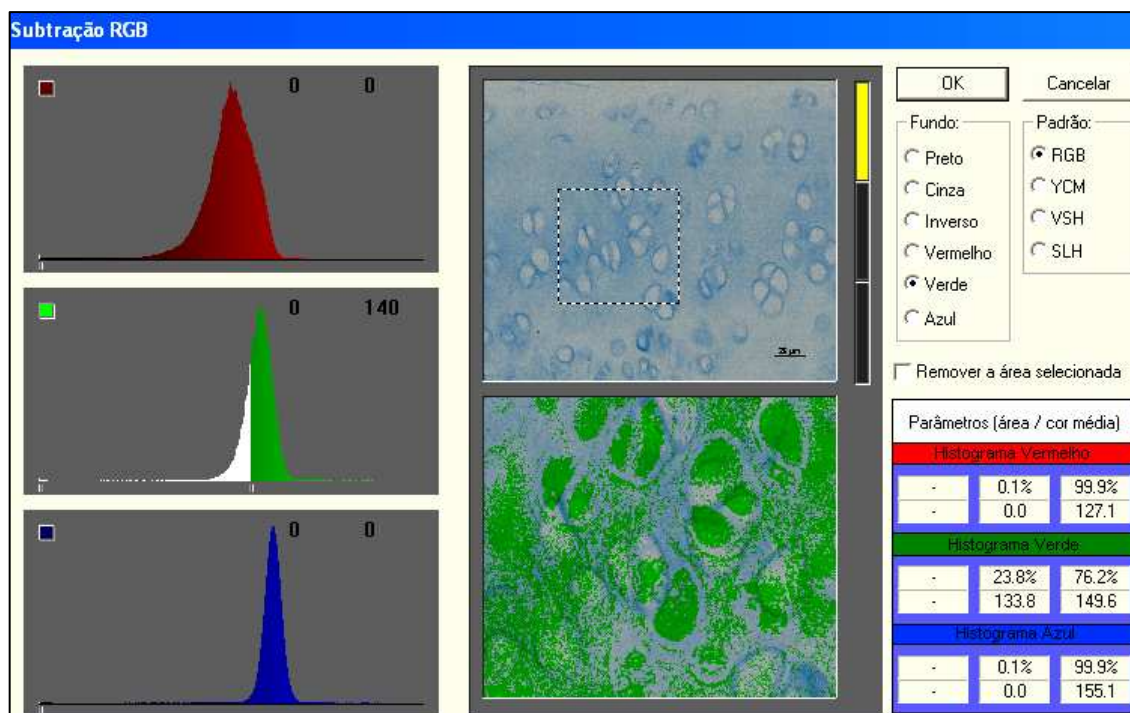


Figura 4 – Sistema *ImageLab*, utilizado para análise dos GAGs sulfatados nas imagens digitalizadas de lâminas submetidas ao teste histoquímico *Alcian Blue* pH 0,5. Aumento 40x.

A análise quantitativa desses GAGs sulfatados pelo sistema *ImageLab* 2000 é um aprimoramento das análises semi-quantitativas antes utilizadas sem auxílio do computador (MATOS *et al.*, 2006). Com isso chegamos às médias das porcentagens dos GAGs sulfatados na cartilagem articular e linha epifisial.

4.8- Extração dos Glicosaminoglicanos

As amostras do fêmur esquerdo foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS), mantidas por duas horas em paraformaldeído 2% a temperatura ambiente e depois armazenadas em PBS na geladeira.

Foi realizada a separação da cartilagem do fêmur distal manualmente com instrumental cirúrgico dissecando-a do osso subjacente descolando-a como uma lâmina. Para padronização da extração, realizavam-se cinco cortes: um corte para a cartilagem da região distal de ambos os côndilos medial e lateral (totalizando dois cortes distais: um para cada côndilo), um corte para a cartilagem da região posterior de ambos os côndilos medial e lateral (totalizando dois cortes posteriores: um para cada côndilo) e um corte anterior extraíndo a cartilagem da região da tróclea. Após os cortes, as porções da cartilagem eram examinadas quanto à presença de osso subcondral aderido às mesmas, que, se presente, era delicadamente retirado com bisturi em um movimento de raspagem. As porções de cartilagem resultantes eram armazenadas em PBS e trituradas com tesoura visando aumentar a área de exposição.

Os fragmentos de cartilagem foram submetidos à proteólise de seu núcleo protéico pela incubação *overnight* com papaína (protease) 1mg/mL em tampão fosfato cisteína pH 6,5 para cada 100 µg de tecido a 60°C . Após esse período, as amostras eram centrifugadas e os GAGs precipitados com a adição de 5 vezes o volume de metanol sendo mantidos a -20°C *overnight* . Após esse período o sobrenadante era centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a secagem do material, ele era pesado individualmente e resuspenso na proporção de 10mg de GAG para 1ml de água destilada.

4.8.1- β-Eliminação

Posteriormente, os GAGs foram liberados dos remanescentes de núcleos protéicos/peptídeos por tratamento com borohidreto de sódio 0,05 M NaOH /1 M *overnight* a temperatura ambiente. As amostras foram neutralizadas pela adição de ácido acético 10% e submetidas à diálise contra água destilada por 4 horas e, em seguida, secas na bomba a vácuo, pesadas e submetidas à eletroforese (CARLSON, 1968).

4.8.2- Distinção e Quantificação dos Glicosaminoglicanos Sulfatados

Através da eletroforese em gel de agarose, foi possível a identificação dos GAGs, separando-os de acordo com o tampão utilizado. O tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato) 0,05M, pH 9,0 distingue os compostos conforme a interação diferencial (por carga) com a diamina

presente no tampão, discriminando, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, os condroitim sulfatos (CS), dermatam sulfatos (DS), heparam sulfatos (HS) e heparinas (HEP). Assim, a heparina é o composto que mais interage com a diamina (Dietrich e Dietrich, 1976).

Para a realização da corrida eletroforética, aproximadamente 50µg de cada amostra foi aplicada no gel de agarose a 0,55%, com espessura de 0,2cm, preparada em tampão 0,05M, pH 9,0. Após a aplicação, as amostras foram submetidas à corrente elétrica (5V/cm) durante 1 hora em caixa refrigerada a 4°C. Como padrão de corrida eletroforética uma mistura de GAGs (CS, DS, HS) de concentração conhecida também foi aplicada ao gel de agarose e submetida às mesmas condições. Como esses compostos possuem carga aniônica, a origem do gel corresponde ao pólo negativo.

Após a corrida eletroforética, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel através da imersão em uma solução de CETAVLON 0,1% por 2 horas. Posteriormente, o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e a seguir corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%. Após a coloração, o gel foi seco a temperatura ambiente e em seguida os GAGs presentes foram quantificados por densitometria comparando-os com as soluções padrões de concentração conhecida de CS, DS e HS adicionadas ao gel de agarose.

4.9- Quantificação do Ácido Hialurônico

A dosagem do ácido hialurônico (AH) foi realizada através de um ensaio fluorimétrico não competitivo tipo ELISA desenvolvido no Departamento de Biologia Molecular da EPM -UNIFESP. Este método detecta de 0,2 a 500µg/L de AH presente nas amostras (MARTINS *et al.*, 2003).

Alíquotas de 100µL da solução final das amostras ou de soluções padrão de concentração conhecida de AH (curva padrão), foram adicionadas a placas de 96 poços, previamente sensibilizadas com proteína de ligação ao AH (1µg/ml), purificada de cartilagem bovina. Estas placas foram incubadas a 4°C por 16 horas. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com tampão Tris-HCL 0,05M, NaCl 0,15M, Tween 20 0,05%, EDTA 7,4mg/mL, azida sódica 0,5g/L pH 7,75.

A seguir, adicionaram-se 100µL da sonda do ácido hialurônico (proteína de ligação do ácido hialurônico extraída da cartilagem bovina, biotinizada – 1mg/ml) diluída 1: 10.000 vezes no tampão de ensaio. Agitou-se a placa por duas horas e realizou-se a lavagem com tampão de lavagem. Após essa etapa, adicionou-se por poço da placa 100µL de estreptavidina marcada com európio (*Delfia Eu-labelling kit*) diluída em 1: 10.000 em tampão de ensaio. A estreptavidina tem afinidade pela biotina ligada à sonda do ácido hialurônico. Agitou-se a placa por uma hora, sendo depois realizada nova lavagem com tampão de lavagem.

Como etapa final, adicionou-se 200µL de solução de realce (*enhancement solution*) por poço liberando o európio da estreptavidina. A fluorescência emitida pelo európio livre foi detectada e lida no fluorímetro *Wallac 2-Victor Multilabell Counter* (Pearkin Elmer Life

Sciences). Os valores obtidos foram processados pelo programa *MultiCalc* (*Perckin Elmer*). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.9.1- Detecção do Ácido Hialurônico por Histoquímica

Para detecção do AH pela técnica da histoquímica, a cartilagem do fêmur distal dos animais pertencentes ao GC e GT foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS- NaCl 120mM, Na₂HPO₄0,05M, NaH₂PO₄ 0,05M pH 7,4), fixado em paraformaldeído 0,2% e embocado em parafina. As amostras foram cortadas em micrótomo na espessura de aproximadamente 10 µm e montados em lâminas sinalizadas. Para a realização do experimento, os cortes foram desparafinados, por aquecimento em estufa a 60°C por 30 minutos, seguido de três banhos de cinco minutos em xilol.

As lâminas foram hidratadas, por submersão em etanol, e em seguida lavadas com água por 2 minutos. Posteriormente a recuperação antigênica foi realizada pela incubação das lâminas em solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 sob aquecimento, por 30 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas três vezes em PBS.

Na etapa seguinte, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio 3% por 35 minutos e lavadas uma vez em água corrente e três vezes em PBS. Em seguida, os cortes foram incubados com PBS BSA1% por 40 minutos, a temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com a proteína de ligação ao AH biotilada, na diluição de 1:100, durante 16 horas a 4°C, em câmara úmida. Após este período, as lâminas foram lavadas cinco

vezes com PBS 0,05M e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase, na diluição de 1:500, em PBS, por 1 hora.

Posteriormente, as lâminas foram reveladas com o cromógeno DAB líquido, por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente, por 5 minutos e contracorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavados por 10 minutos, em água corrente.

4.10- Técnica Histoquímica *Picro-Sirius-Red* para Avaliação do Colágeno

Cortes do fêmur direito com as respectivas cartilagens articulares fixadas em solução de formaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, descalcificados em ácido fórmico 25%, pH 2,0, desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizado em xilol e incluído em parafina) foram selecionados e submetidos à técnica histoquímica de *Picro-Sirius*, método que evidencia as fibras colágenas em vermelho-alaranjado. Essas lâminas foram desparafinizados em xilol, hidratadas em gradiente decrescente de álcool, em seguida foram lavadas em água corrente por 5 minutos, e lavadas três vezes em água destilada, sendo coradas em solução de *Sirius Red* a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado por 60 minutos. Os cortes foram lavados duas vezes em solução de HCl 0,01N por 2 minutos cada, evidenciados pela hematoxilina por seis minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados e diafanizados pelo xilol. Ao final as lâminas foram montadas com *Entellan*.

O grau de positividade do colágeno na cartilagem articular, na linha epifisial e nas trabéculas ósseas foi avaliado semi-quantitativamente com auxílio do microscópio de luz sendo graduado de + a ++++.

4.11-Análise Estatística

Foi realizado o teste de normalidade de distribuição dos dados para todas as variáveis quantitativas avaliadas, teste de *Kolmogorov-Smirnov*, sendo que nenhuma das medidas apresentou fuga de normalidade de distribuição ($p > 0,05$), sendo assim foram realizados testes *t de Student* para comparar o GC e GT.

Para avaliação do grau de positividade do colágeno na microscopia de luz e da classificação histológica da OARSI foram descritas frequências absolutas e relativas segundo grupos e realizados testes de *Mann-Whitney* para comparar o GC e GT.

Na avaliação do grau de positividade do colágeno foi utilizado, como frequência, o valor que se repete nos dois cortes ou o menor valor.

5- RESULTADOS

5.1- Análise Histomorfológica

5.1.1- Contagem de Condrócitos das Zonas Superficial e Intermediária Agrupadas e da Zona Profunda da Cartilagem Articular na Área de Não Carga

Os resultados obtidos com a histomorfometria para a média do número de condrocitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de não carga podem ser observados nas Tabelas 1 e 2. Os gráficos demonstrando estes resultados são apresentados na Figura 5 e Figura 6. A Figura 7 ilustra as diferenças entre fotomicrografias do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT).

Tabela 1- Análise estatística do número de condrocitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de não carga

Resultado do teste *t-Student*

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
Número Condrócitos Zona Superficial Intermediária Área Não Carga	24,41	5,10	12	32,58	3,99	12	<0,001
Número Condrócitos Zona Profunda Área Não Carga	20,50	3,50	12	21,67	2,99	12	0,390

(1)DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 2 – Média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de não-carga

Animal	Número de Condrócitos Zona Superficial e Intermediária Área de Não-Carga	Número de Condrócitos Zona Profunda Área de Não-Carga
RC1	24,33	20
RC2	20,33	21
RC3	18,33	19
RC4	23,33	21
RC5	21	20
RC6	25,66	22
RC7	28,66	24
RC8	27,33	23
RC9	23,66	20
RC10	16,33	11
RC11	29,66	20
RC12	34,33	25
RT1	34,33	24
RT2	34,67	21
RT3	33	25
RT4	34	17
RT5	28,66	20
RT6	28,66	17
RT7	33	20
RT8	29,66	20
RT9	29,33	24
RT10	40	26
RT11	38,33	24
RT12	27,33	22

(1)RC-Rato do grupo controle (2)RT-Rato do grupo treinado

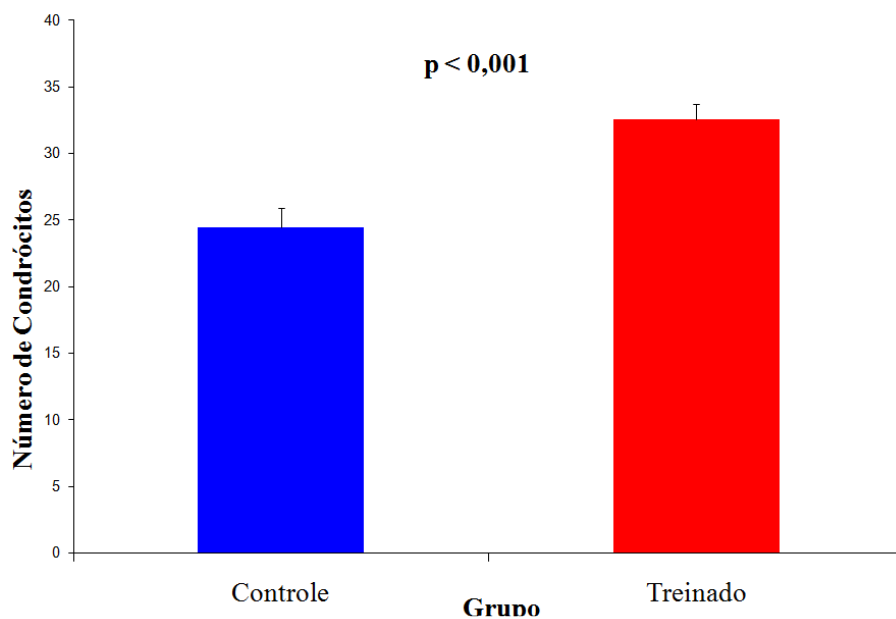


Figura 5- Gráfico da média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas da cartilagem articular na área de não carga

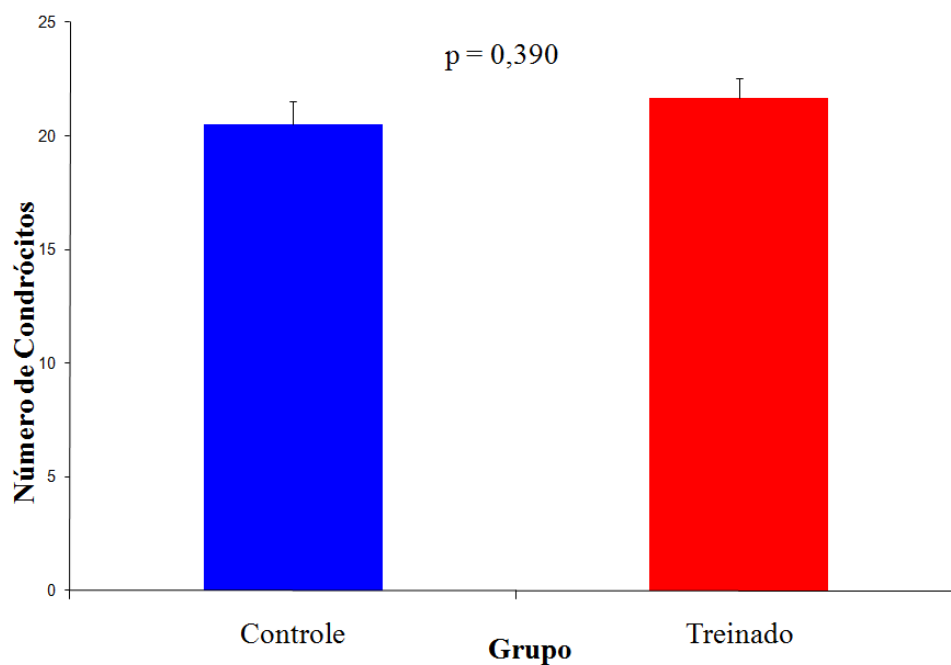


Figura 6- Gráfico da média do número de condrócitos da zona profunda da cartilagem articular na área de não carga

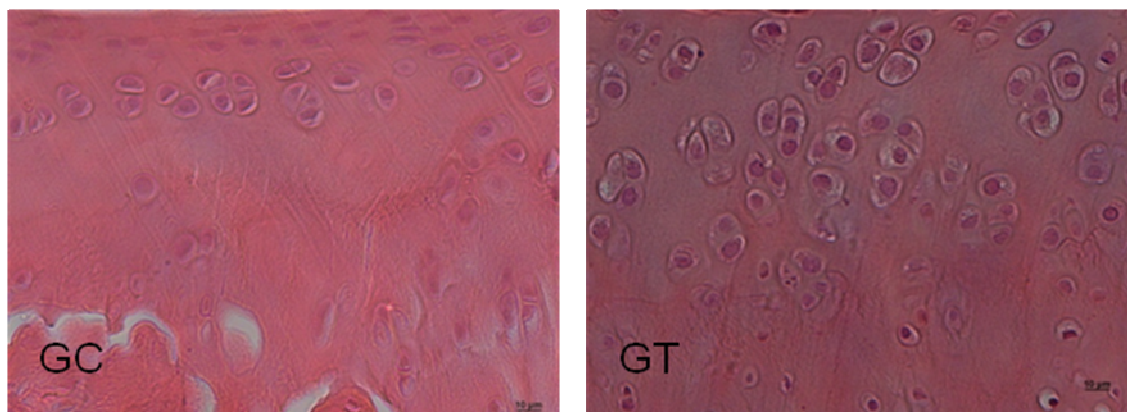


Figura 7 – Fotomicrografias da cartilagem articular do grupo controle (GC) e grupo treinado (GT) corados com Hematoxilina-Eosina mostrando a diferença do número de condrócitos na cartilagem articular (CA). Aumento 40x.

O GT apresentou um maior número de condrócitos do que o GC nas zonas superficial e intermediária agrupadas da cartilagem articular na área de não carga, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Na zona profunda da cartilagem articular na área de não carga, o GT apresentou um maior número de condrócitos, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

5.1.2- Contagem de Condrócitos das Zonas Superficial e Intermediária Agrupadas e da Zona Profunda da Cartilagem Articular na Área de Carga

Os resultados obtidos com a histomorfometria para a média do número de condrocitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de carga podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. Os gráficos demonstrando estes resultados são apresentados nas Figuras 8 e 9. A Figura 7 ilustra as diferenças entre fotomicrografias do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT).

O GT apresentou um maior número de condrocitos do que o GC nas zonas superficial e intermediária agrupadas, como também na zona profunda da cartilagem articular na área de carga, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

Tabela 3- Análise estatística do número de condrocitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de carga

Resultado do teste *t-Student*

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
Número Condrócitos Zona Superficial e Intermediária Área Carga	24,75	5,31	12	30,83	7,67	12	0,034
Número Condrócitos Zona Profunda Área Carga	5,67	1,23	12	7,67	1,30	12	0,001

(1) DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 4 – Média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas e da zona profunda da cartilagem articular na área de carga

Animal	Número de Condrócitos Zona Superficial e Intermediária Área de Carga	Número de Condrócitos Zona Profunda Área de Carga
RC1	32	7
RC2	26	8
RC3	34	7
RC4	29	6
RC5	25	5
RC6	17	6
RC7	25	5
RC8	26	4
RC9	17	5
RC10	24	4
RC11	20	6
RC12	22	5
RT1	49	7
RT2	41	8
RT3	29	7
RT4	29	7
RT5	27	6
RT6	23	9
RT7	23	5
RT8	25	8
RT9	28	8
RT10	34	9
RT11	34	9
RT12	28	9

(1)RC-Rato do grupo controle (2)RT-Rato do grupo treinado

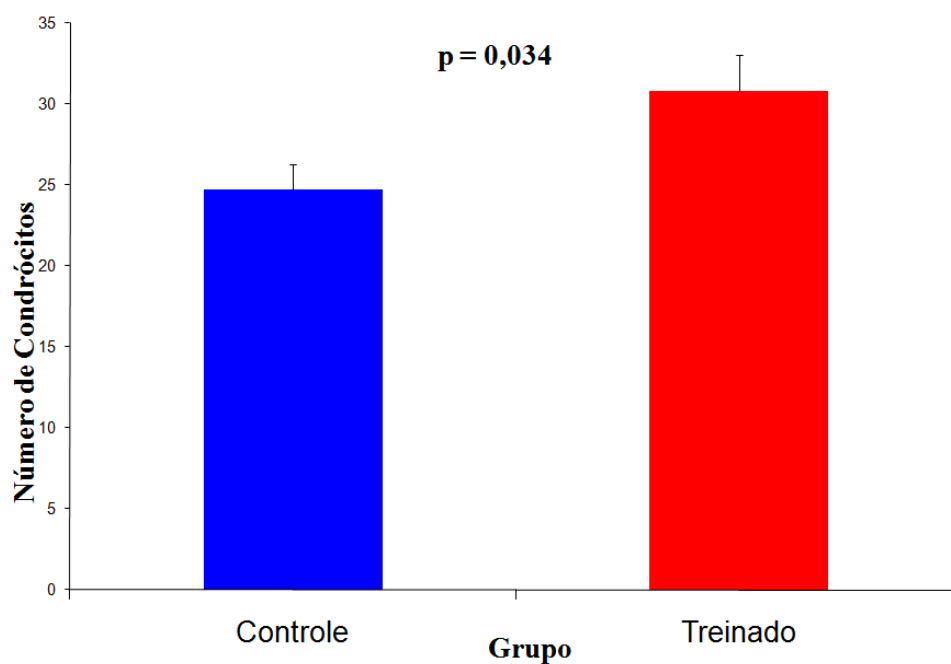


Figura 8- Gráfico da média do número de condrócitos das zonas superficial e intermediária agrupadas da cartilagem articular na área de carga

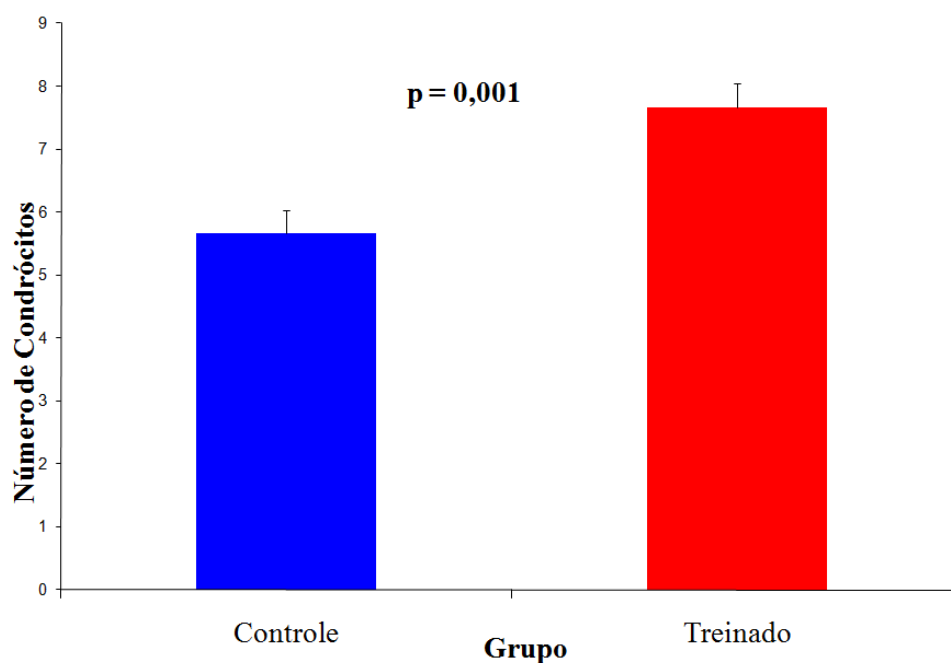


Figura 9- Gráfico da média do número de condrócitos da zona profunda da cartilagem articular na área de carga

5.1.3- Contagem dos Pares de Clones de Condrócitos da Cartilagem Articular

Os resultados obtidos para o número de pares de clones de condrócitos presentes na cartilagem articular podem ser observados nas Tabelas 5 e 6. O gráfico representativo é apresentado na Figura 10. A Figura 11 ilustra as diferenças entre fotomicrografias do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT).

O número de pares de clones de condrócitos foi maior no GT do que no GC, apresentando uma diferença estatisticamente significante.

Tabela 5-Análise estatística do número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular

Resultado do teste
t-Student

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
Pares Clones Condrócitos	4,58	1,56	12	6,75	0,97	12	<0,001

(1) DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 6 – Número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular

Animal	ParesClones
RC1	6
RC2	5
RC3	3
RC4	5
RC5	4
RC6	3
RC7	5
RC8	6
RC9	3
RC10	2
RC11	6
RC12	7
RT1	7
RT2	6
RT3	6
RT4	7
RT5	5
RT6	8
RT7	8
RT8	6
RT9	7
RT10	6
RT11	7
RT12	8

(1)RC-Rato do grupo controle (2)RT-Rato do grupo treinado

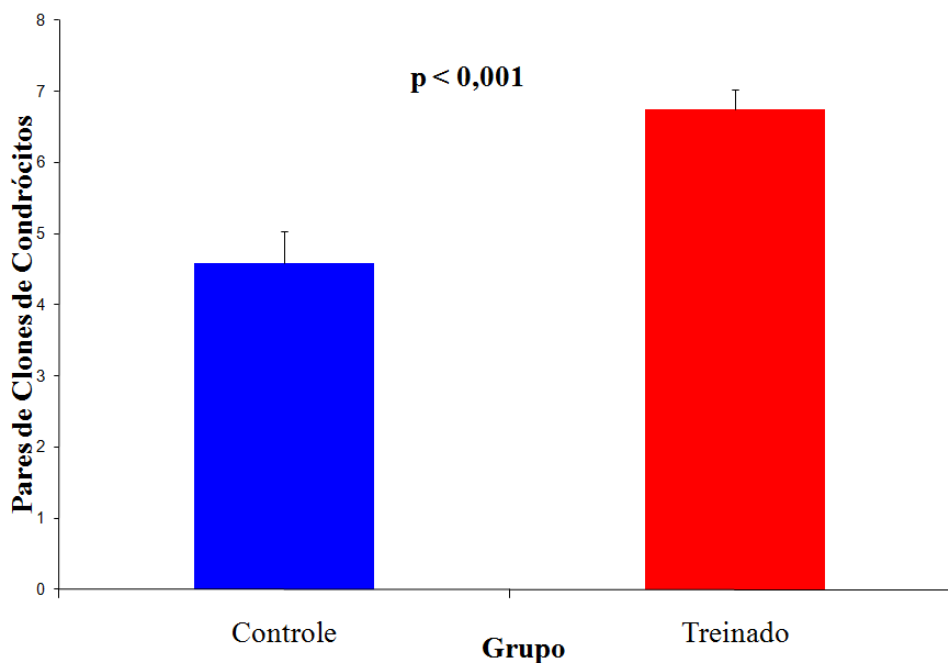


Figura 10- Gráfico da média do número de pares de clones de condrócitos da cartilagem articular

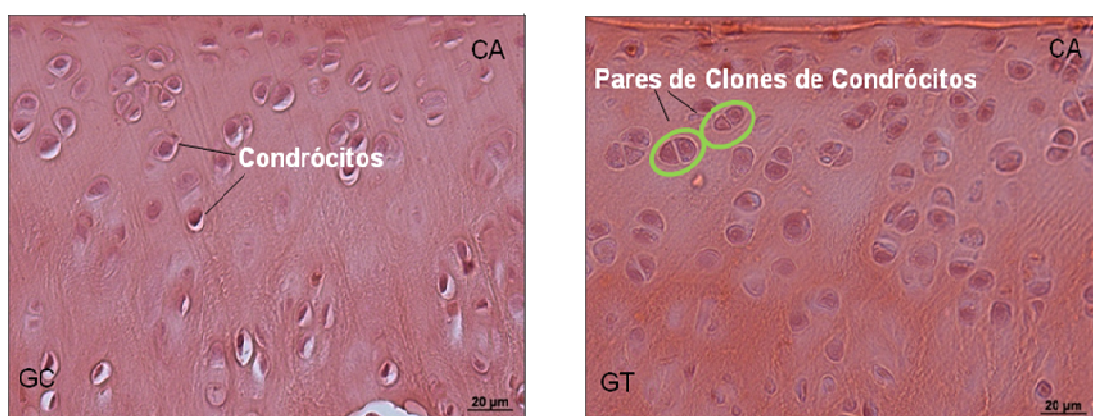


Figura 11- Fotomicrografias da cartilagem articular (CA) do grupo controle (GC) e grupo treinado (GT) corados com Hematoxilina-Eosina ilustrando a diferença do número de pares de clones de condrócitos. Aumento 40x.

5.1.4- Classificação Histológica de Osteoartrose da *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI)

Os resultados obtidos para a classificação OARSI podem ser observados nas Tabelas 7 e 8. O gráfico representativo é apresentado na Figura 12. A Figura 13 ilustra uma fotomicrografia do GT com células de aspecto irregular compatível com o processo de morte celular.

Os cortes histológicos do GC foram classificadas em sua maioria como grau 0 e alguns como grau 1. Os cortes histológicos do GT foram classificados em sua maioria como grau 1.5 por apresentarem presença marcante de células com aspecto irregular que denotam morte celular (encolhimento da célula, aspecto de lacunas vazias e núcleo picnótico) e alguns cortes histológicos foram classificadas como grau 1. Não houve nenhuma classificação grau 1.5 no GC e grau 0 no GT. Não houve nenhuma classificação maior que grau 1.5 em ambos os grupos.

Tabela 7- Análise estatística da classificação OARSI

**Resultado do teste
Mann-Whitney**

OARSI	Grupo				Total		p
	Controle		Treinado				
	N	%	N	%	N	%	
0	7	70,0	0	0,0	7	35,0	<0,001
1	3	30,0	4	40,0	7	35,0	
1,5	0	0,0	6	60,0	6	30,0	
Total	10	100	10	100	20	100	

(1)N-Número

Tabela 8- Classificação OARSI

Animal	OARSI
RC1	0
RC2	1
RC3	0
RC4	0
RC5	0
RC6	0
RC7	1
RC8	0
RC9	0
RC10	1
RT1	1
RT2	1,5
RT3	1,5
RT4	1,5
RT5	1
RT6	1,5
RT7	1,5
RT8	1
RT9	1,5
RT10	1

(1)RC-Rato do grupo controle (2)RT-Rato do grupo treinado

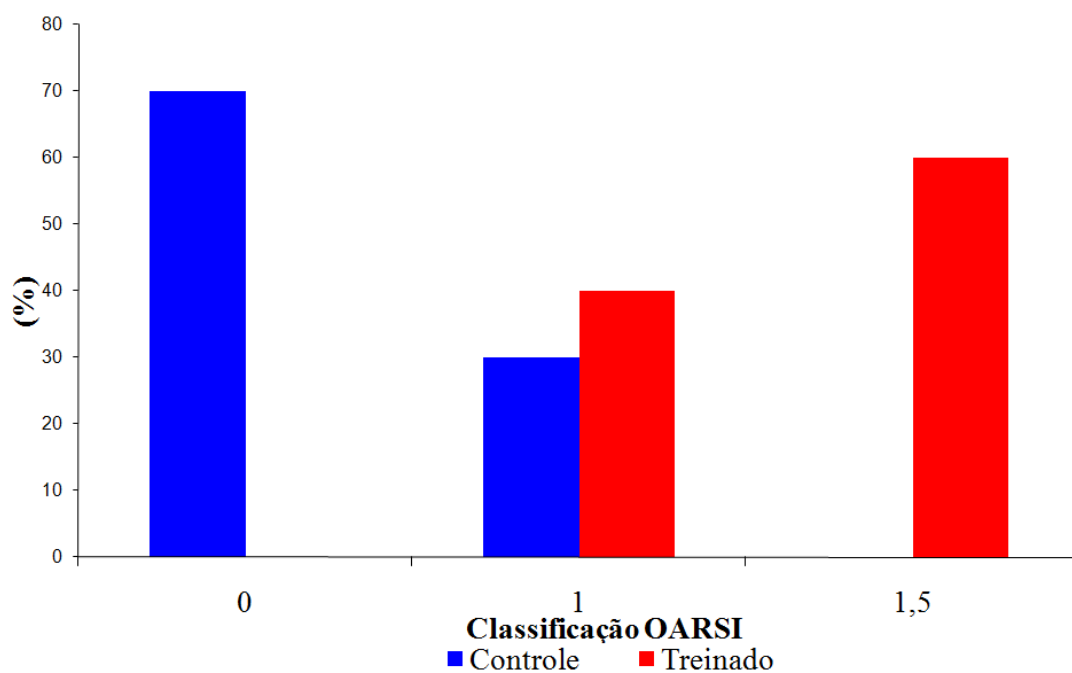


Figura 12- Gráfico classificação OARSI

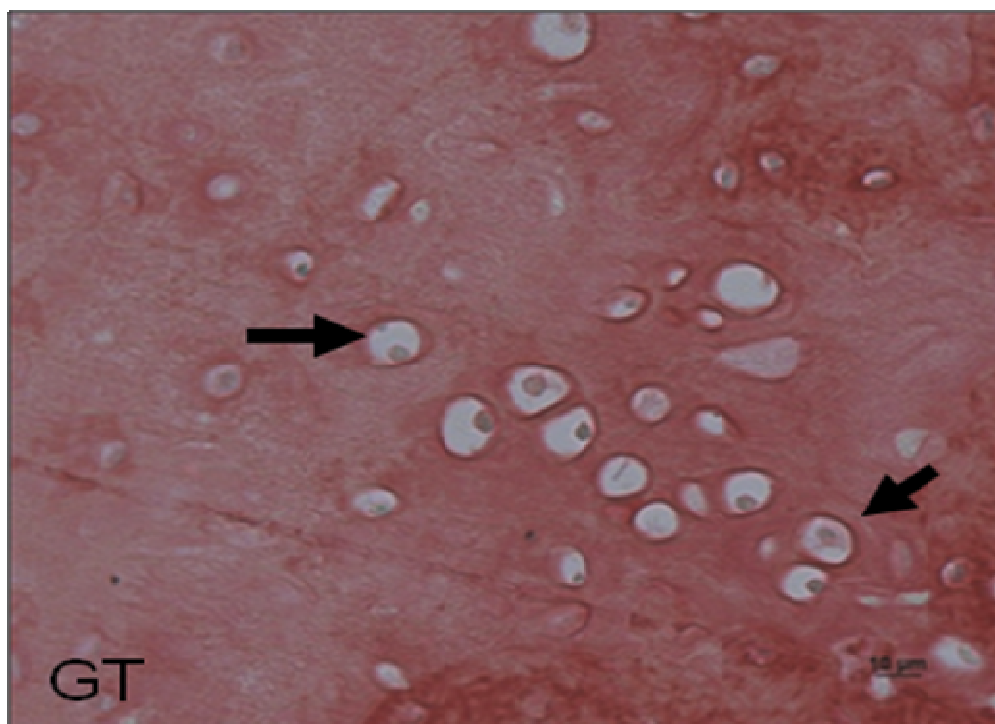


Figura 13- Fotomicrografia da cartilagem articular do grupo treinado (GT) apresentando células de aspecto irregular com características de morte celular. Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento 40x.

5.1.5- Espessuras da Cartilagem Articular e da Linha Epifisial

Os resultados obtidos com a histomorfometria realizada para mensurar a espessura da cartilagem articular e da linha epifisial são demonstrados nas Tabelas 9 e 10. Os gráficos representativos são apresentados nas Figuras 14 e 15.

O GT apresentou uma menor espessura da cartilagem articular do que o GC, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa. O GT apresentou uma menor espessura da linha epifisial do que o GC, porém, essa diferença também não foi estatisticamente significativa.

Tabela 9- Análise estatística das espessuras da cartilagem articular e da linha epifisial

**Resultado do teste
t-Student**

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
Espessura Cartilagem Articular	249,02	61,03	12	225,81	74,64	12	0,413
Espessura Linha Epifisial	180,85	31,89	12	209,84	37,02	12	0,052

(1) DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 10 – Espessuras da cartilagem articular e da linha epifisial

Animal	Espessura Cartilagem Articular	Espessura Linha Epifisial
RC1	192,87	172,17
RC2	253,74	186,46
RC3	174,52	167,48
RC4	186,48	135,73
RC5	246,29	180,17
RC6	360,63	187,26
RC7	367,36	238,18
RC8	232,34	224,85
RC9	240,6	153
RC10	271,6	182,94
RC11	217,63	207,2
RC12	244,21	134,74
RT1	172,93	215,1
RT2	177,94	171,15
RT3	110,53	172,09
RT4	111,47	186,53
RT5	239,41	187,85
RT6	238,47	192,35
RT7	238,84	191,94
RT8	367,98	210,98
RT9	261,16	307,15
RT10	312,33	228,88
RT11	240,72	221,88
RT12	237,9	232,15

(1)RC-Rato do grupo controle (2)RT-Rato do grupo treinado

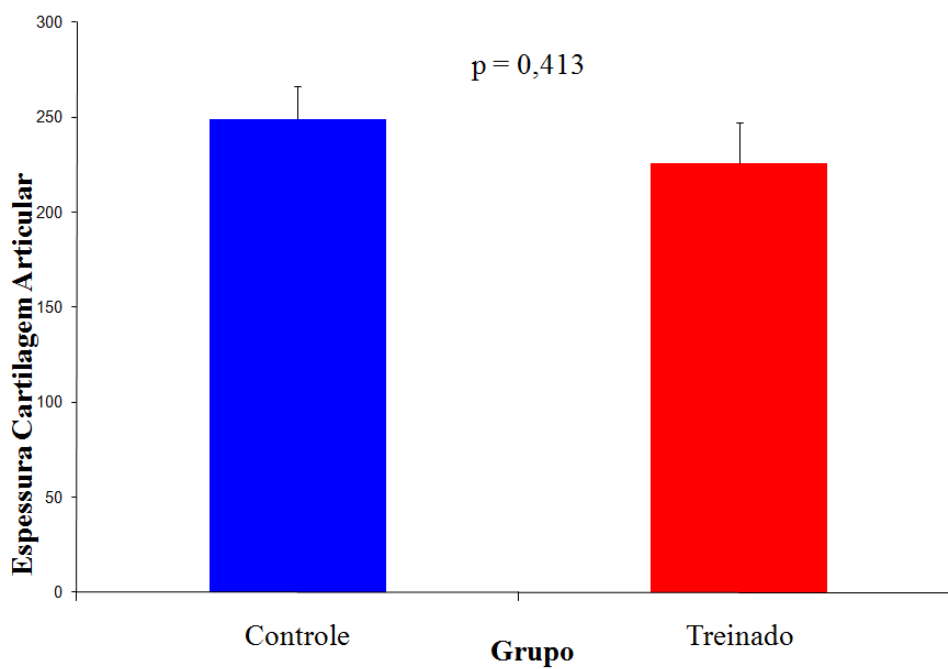


Figura 14- Gráfico da espessura da cartilagem articular

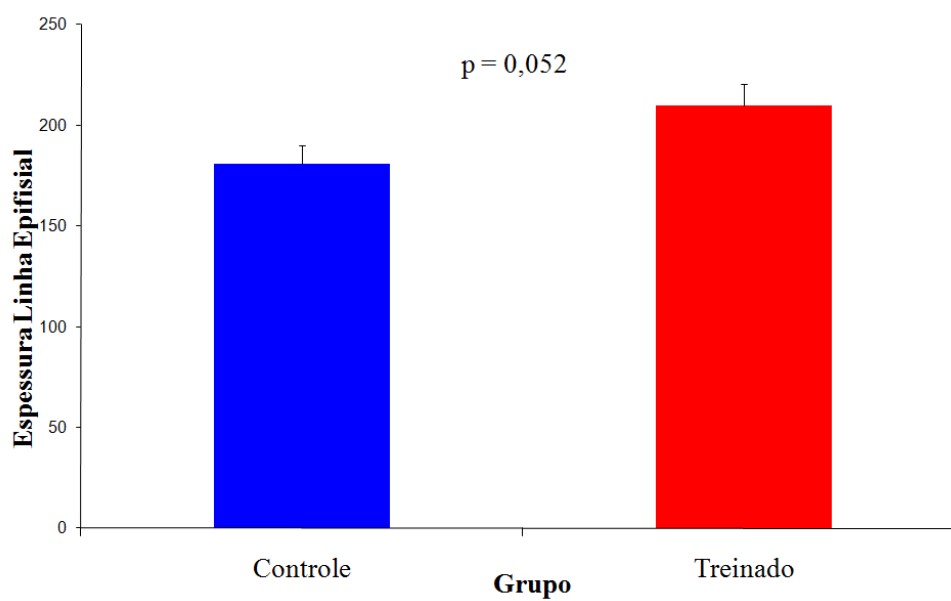


Figura 15-Gráfico da espessura da linha epifisial

5.2- Análise Histoquímica pela Técnica *Alcian Blue* pH 0,5

5.2.1- Análise Histoquímica da Cartilagem Articular pela Técnica *Alcian Blue* pH 0,5

Os resultados da análise histoquímica com *Alcian Blue* pH 0,5 para a cartilagem articular estão demonstrados nas Tabelas 11 e 12. O gráfico que representa estes resultados é demonstrado na Figura 16. A Figura 17 ilustra fotomicrografias do GC e do GT.

Através do método histoquímico com *Alcian Blue* pH 0,5, não foi observada diferença significativa quanto à quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados na cartilagem articular entre os grupos estudados.

Tabela 11- Análise estatística da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da cartilagem articular

Resultado do teste t-Student

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
%GAGsulfatado Cartilagem Articular	18,67	5,77	12	19,28	5,59	12	0,793

(1) DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 12 - Quantificação percentual dos GAGs sulfatados da cartilagem articular

Animal	%GAGsulfatado Cartilagem Articular
RC1	23,4
RC2	21,5
RC3	21,6
RC4	20,9
RC5	22,8
RC6	24,1
RC7	10,2
RC8	12,1
RC9	9,6
RC10	12,4
RC11	24,5
RC12	20,9
RT1	24,3
RT2	20,9
RT3	26,1
RT4	23,2
RT5	12,1
RT6	17,8
RT7	13,1
RT8	23,1
RT9	19
RT10	23,7
RT11	20,1
RT12	8

(1)RC-Rato do grupo controle (2)RT-Rato do grupo treinado

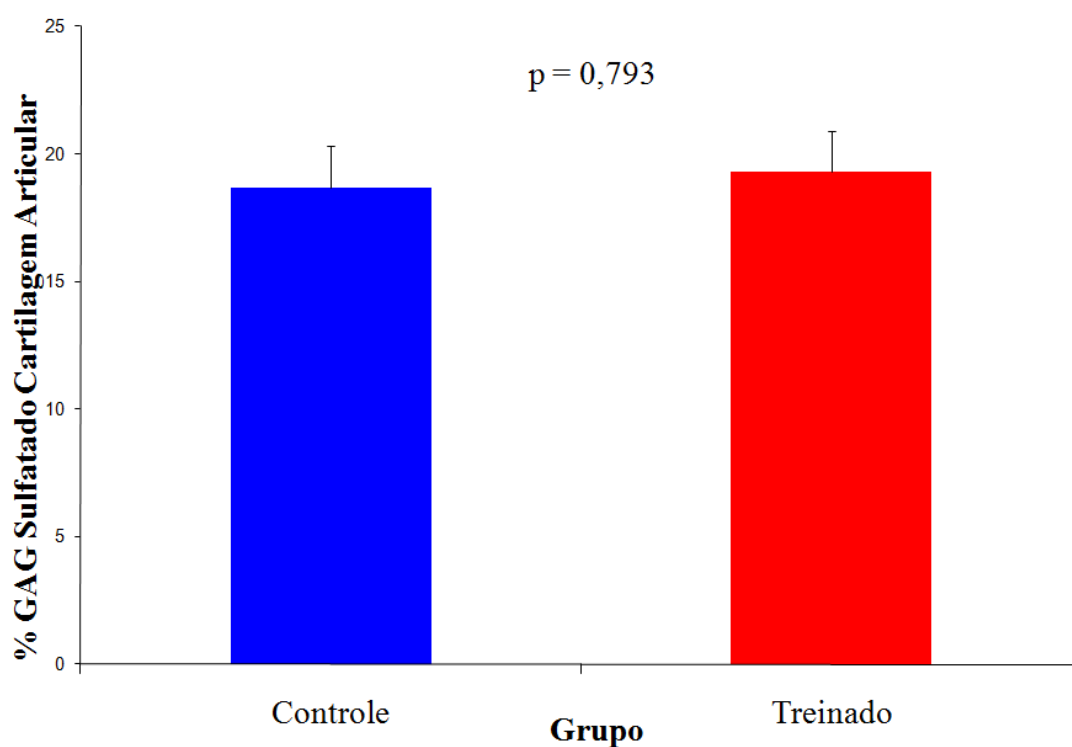


Figura 16 - Gráfico da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da cartilagem articular

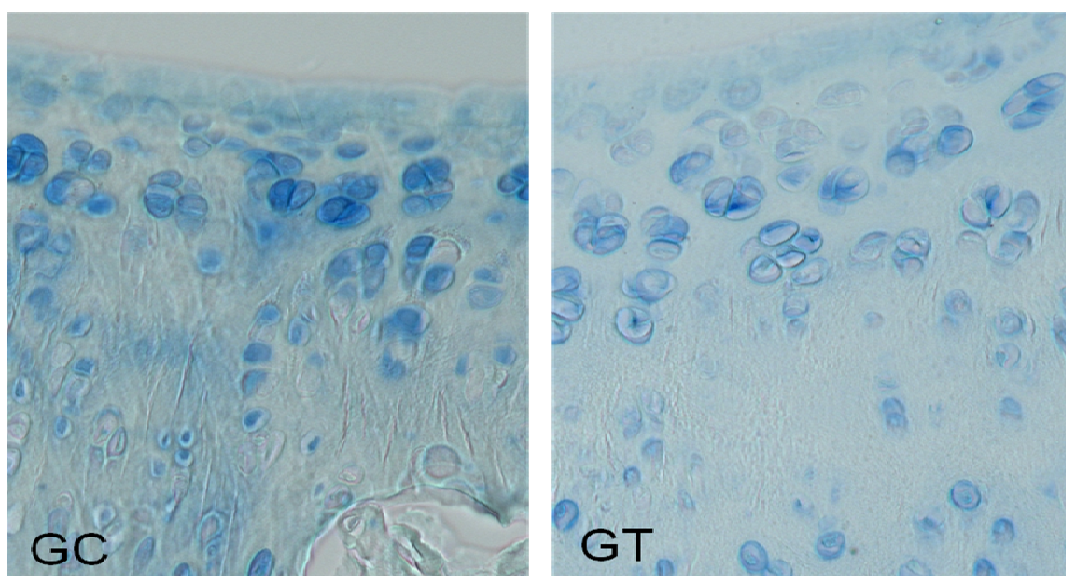


Figura 17- Fotomicrografias da cartilagem articular do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT) coradas com *Alcian Blue* pH 0,5. Aumento 40x.

5.2.2 - Análise Histoquímica da Linha Epifisial pela Técnica *Alcian Blue* pH 0,5

Os resultados da análise histoquímica com *Alcian Blue* pH 0,5 para a linha epifisial estão demonstrados nas Tabelas 13 e 14. O gráfico que representa estes resultados é demonstrado na Figura 18. A Figura 19 ilustra fotomicrografias do GC e do GT.

Através do método histoquímico com *Alcian Blue* pH 0,5, não foi observada diferença significativa quanto a quantidade de GAGs sulfatados na linha epifisial entre os grupos estudados.

Tabela 13 - Análise estatística da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da linha epifisial

Resultado do teste

t-Student

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
%GAG Sulfatado Linha Epifisial	42,63	6,17	12	43,65	11,84	12	0,794

(1) DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 14 - Quantificação percentual dos GAGs sulfatados da linha epifisial

Animal	% GAG Sulfatado Linha Epifisial
RC1	35,9
RC2	40,1
RC3	40,1
RC4	38,8
RC5	59,2
RC6	48,9
RC7	44,2
RC8	42,8
RC9	42,1
RC10	41,9
RC11	38,7
RC12	38,9
RT1	69
RT2	54,8
RT3	41,8
RT4	40,5
RT5	40,2
RT6	39,7
RT7	53,5
RT8	40,1
RT9	43,7
RT10	31,8
RT11	46,8
RT12	21,9

(1)RC- Rato do grupo controle (2)RT- Rato do grupo treinado

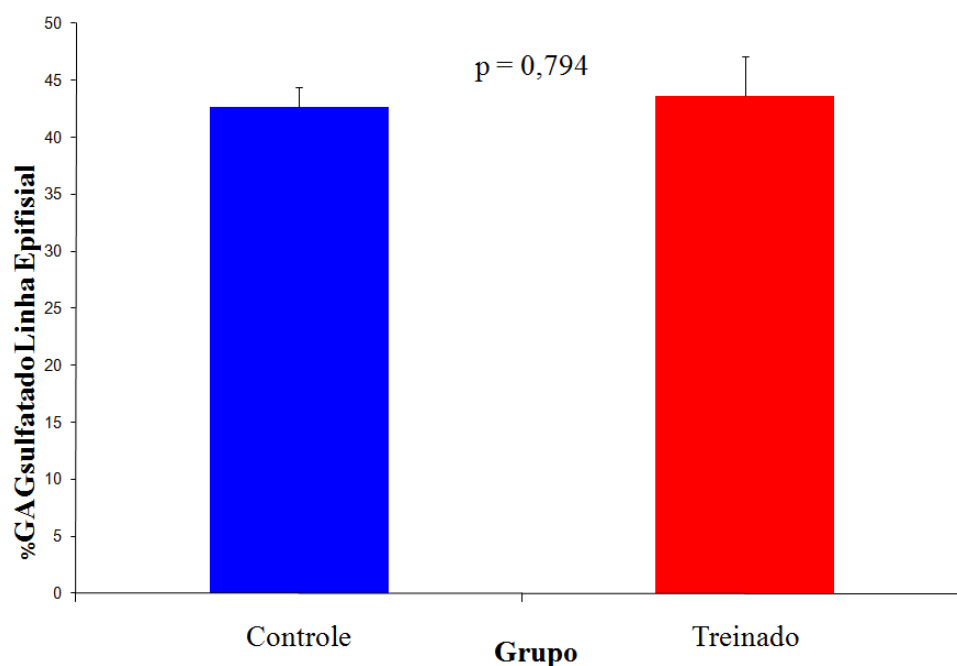


Figura 18 - Gráfico da quantificação percentual dos GAGs sulfatados da linha epifisial

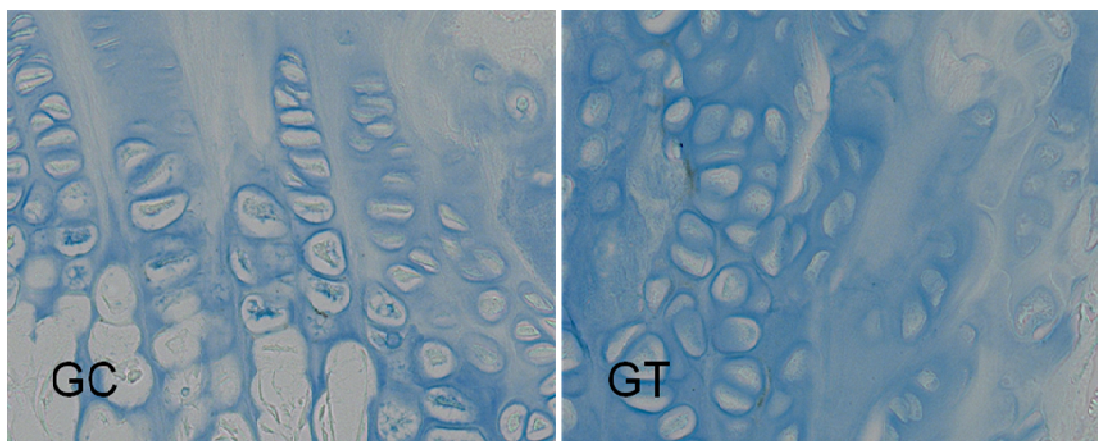


Figura 19 – Fotomicrografias da linha epifisial do do grupo controle (GC) e do grupo treinado (GT) corados com *Alcian Blue* pH 0,5. Aumento 40x.

5.3- Extração e Quantificação dos Glicosaminoglicanos Sulfatados da Cartilagem Articular

Os resultados da quantificação por densitometria dos GAGs sulfatados em seis animais de cada grupo estão demonstrados nas Tabelas 15 e 16. O gráfico que representa estes resultados é demonstrado na Figura 20. A Figura 21 é o resultado final da eletroforese após β -eliminação do GC e GT.

O GT apresentou uma menor quantidade de GAG sulfatado do que o GC, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

Ambos os grupos GC e GT apresentaram o condroitim sulfato como principal GAG sulfatado de sua composição.

Tabela 15- Análise estatística da quantificação dos GAGs sulfatados da cartilagem articular

Resultado do teste
t-Student

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
Quantificação GAG/Tecido	1,33	0,29	6	0,52	0,10	6	<0,001

(1)DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 16- Quantificação dos GAGs sulfatados da cartilagem articular

Animal	GAG/Tecido - $\mu\text{g/g}$
RC1	1,38
RC2	1,69
RC3	1,49
RC4	1,44
RC5	1,1
RC6	0,9
RT1	0,39
RT2	0,4
RT3	0,6
RT4	0,57
RT5	0,58
RT6	0,58

(1)RC- Rato do grupo controle (2)RT- Rato do grupo treinado

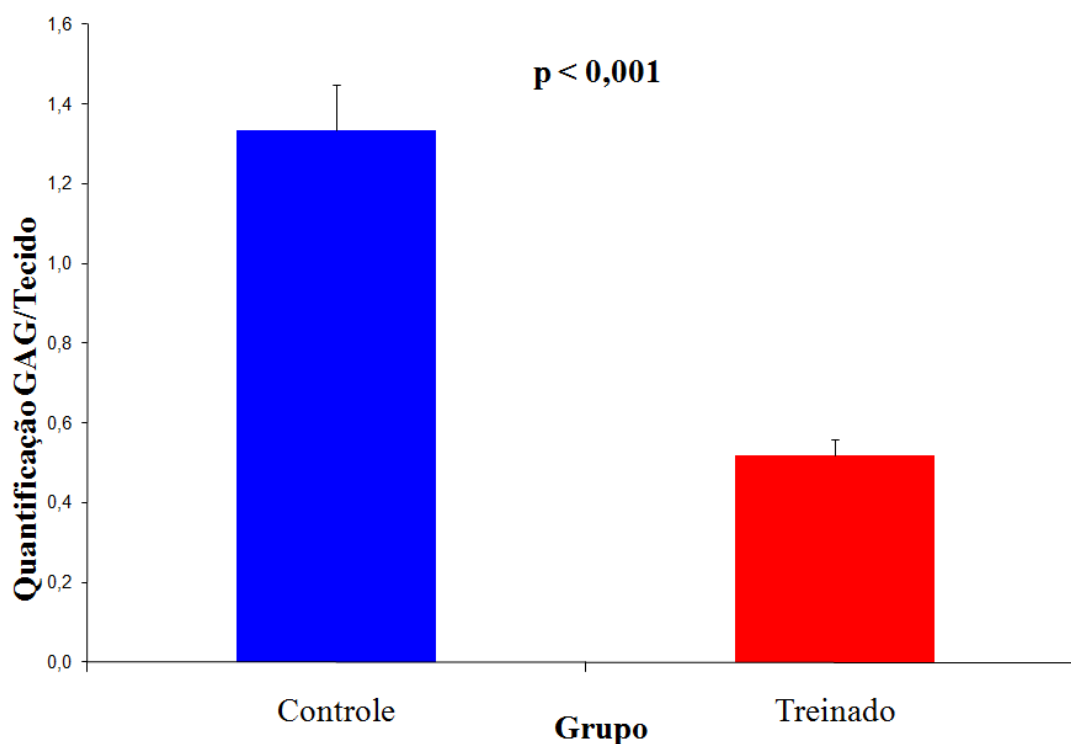


Figura 20- Gráfico da média de quantificação dos GAGs sulfatados da cartilagem articular

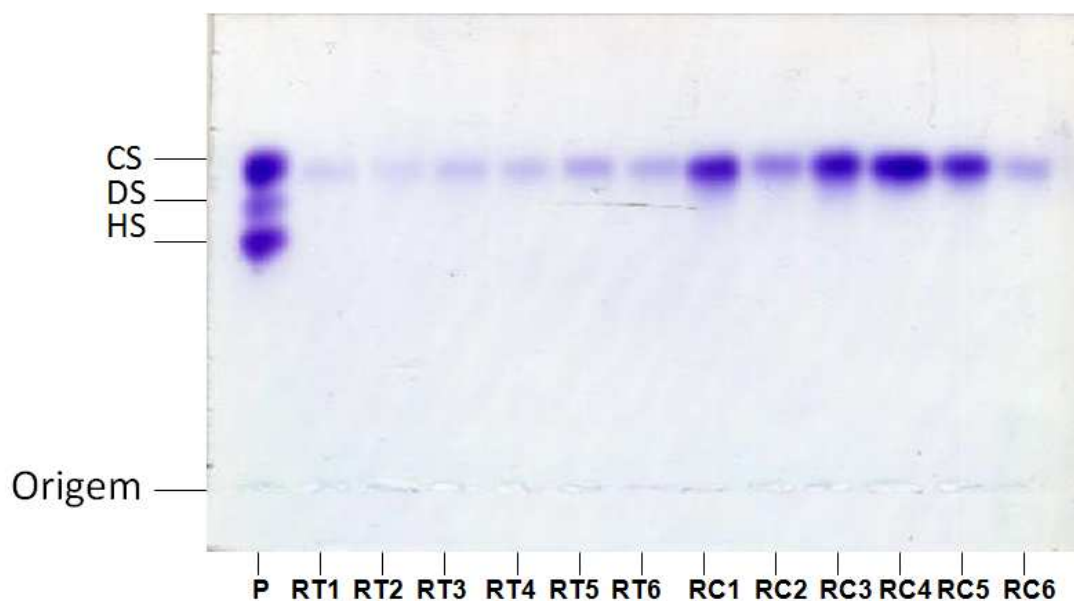


Figura 21 – Eletroforese após β -eliminação do grupo controle e grupo treinado. (1)RC- Rato do grupo controle (2)RT- Rato do grupo treinado (3)P- Concentrações conhecidas dos glicosaminoglicanos CS,DS e HS aplicadas ao gel de agarose (4)CS- condroitim sulfato (5)DS- dermatam sulfato (6)HS- heparam sulfato

5.4- Quantificação e Detecção do Ácido Hialurônico da Cartilagem Articular

Os resultados da quantificação do ácido hialurônico (AH) em cinco animais de cada grupo, por meio do ensaio fluorimétrico não competitivo tipo ELISA, estão demonstrados nas Tabela 17 e 18. O gráfico que representa estes resultados é demonstrado na Figura 22.

O GT apresentou uma menor quantidade de AH do que o GC, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

Na detecção do AH, o GT apresentou uma coloração de menor intensidade do que o GC como demonstra a Figura 23.

Tabela 17 – Análise estatística da quantificação do AH da cartilagem articular

Resultado do teste
t-Student

Variável	Grupo						p
	Controle			Treinado			
	Média	DP	N	Média	DP	N	
Quantificação AH/Tecido	435,01	147,10	5	208,77	76,80	5	0,016

(1)DP-Desvio Padrão (2)N-Número

Tabela 18 – Quantificação do AH da cartilagem articular

Animal	AH/Tecido - $\mu\text{g/g}$
RC7	209,3
RC8	503,35
RC9	364,5
RC10	549,45
RC11	548,45
RT7	230,75
RT8	111,7
RT9	163,55
RT10	222
RT11	315,85

(1)RC- Rato do grupo controle (2)RT- Rato do grupo treinado

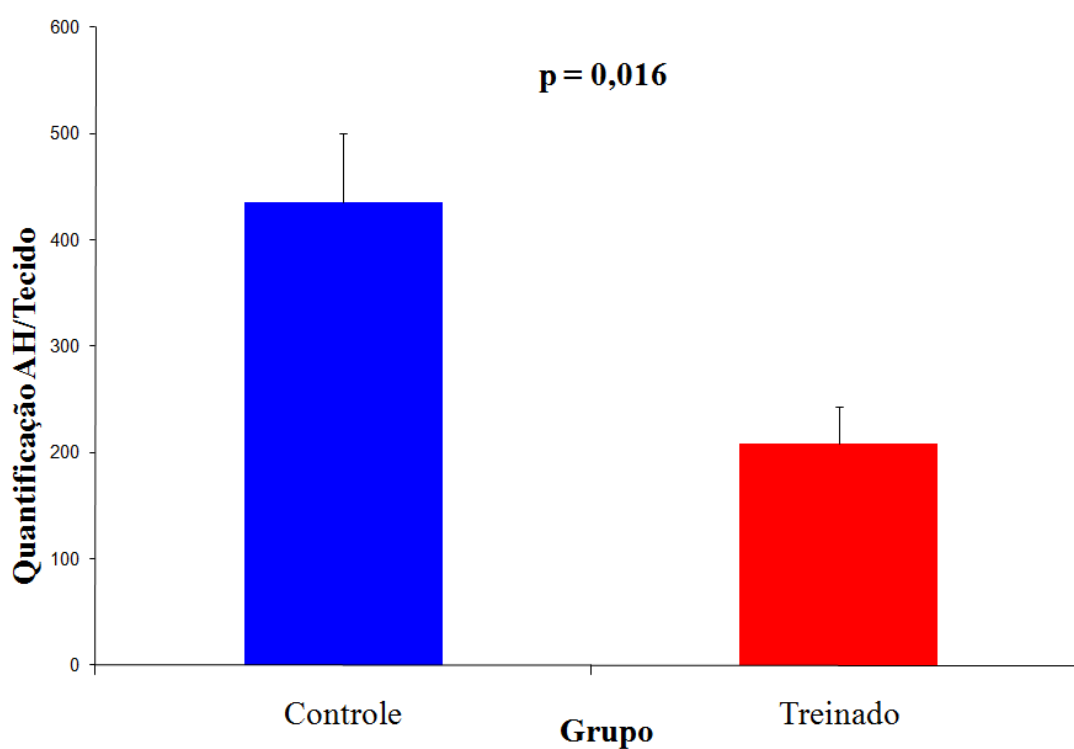


Figura 22 – Gráfico da quantificação AH da cartilagem articular

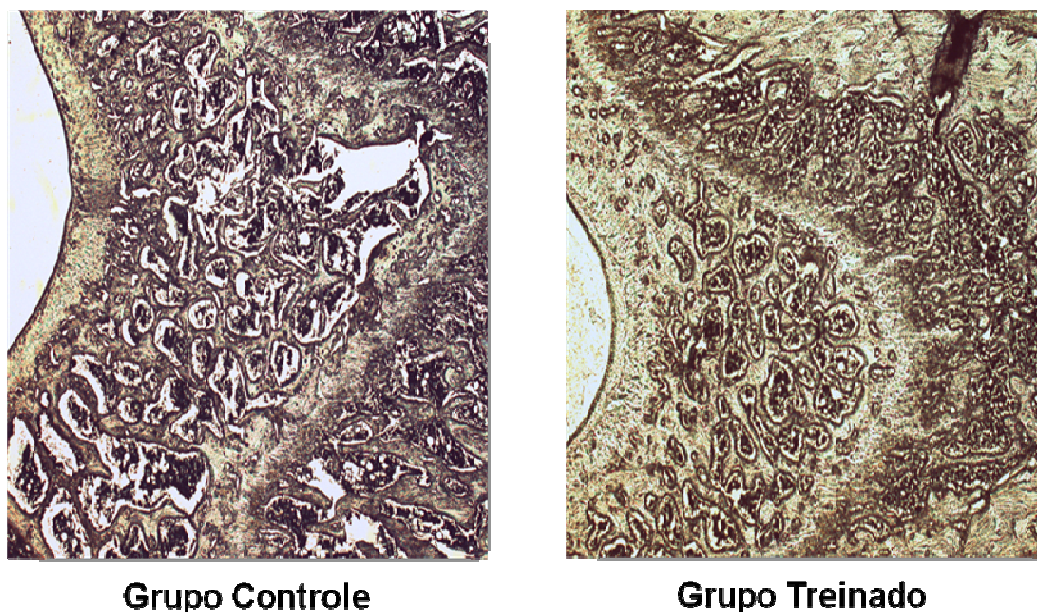


Figura 23 – Detecção do AH por método histoquímico. Fotomicrografias dos fêmures distais do grupo controle e do grupo treinado. Cromógeno DAB líquido e contra-colaração com Hematoxilina de Harris. Aumento 2,5x.

5.5 - Técnica Histoquímica *Picro-Sirius-Red* para Avaliação do Colágeno

Os resultados da avaliação semi-quantitativa do grau de positividade do colágeno estão demonstrados na Tabela 19. A Figura 24 ilustra fotomicrografias do GC e do GT.

Tabela 19- Análise estatística do grau de positividade do colágeno

Intensidade de coloração	Grupo				Total		p
	Controle		Treinado		n	%	
	n	%	n	%			
Colágeno ZS							>0,999
++	5	50,0	5	50,0	10	50,0	
+++	4	40,0	4	40,0	8	40,0	
++++	1	10,0	1	10,0	2	10,0	
Colágeno ZI							0,796
+	2	20,0	3	30,0	5	25,0	
++	6	60,0	3	30,0	9	45,0	
+++	2	20,0	4	40,0	6	30,0	
Colágeno ZP							0,315
+	3	30,0	6	60,0	9	45,0	
++	6	60,0	3	30,0	9	45,0	
+++	1	10,0	1	10,0	2	10,0	
Colágeno LE							>0,999
+	10	100,0	10	100,0	20	100,0	
Colágeno Osso							0,529
++	1	10,0	1	10,0	2	10,0	
+++	1	10,0	3	30,0	4	20,0	
++++	8	80,0	6	60,0	14	70,0	
Total	10	100	10	100	20	100	

(1)Colágeno ZS-Colágeno da zona superficial da cartilagem articular

(2)Colágeno ZI-Colágeno da zona intermediária da cartilagem articular

(3)Colágeno ZP-Colágeno da zona profunda da cartilagem articular

(4)Colágeno LE-Colágeno da linha epifisial

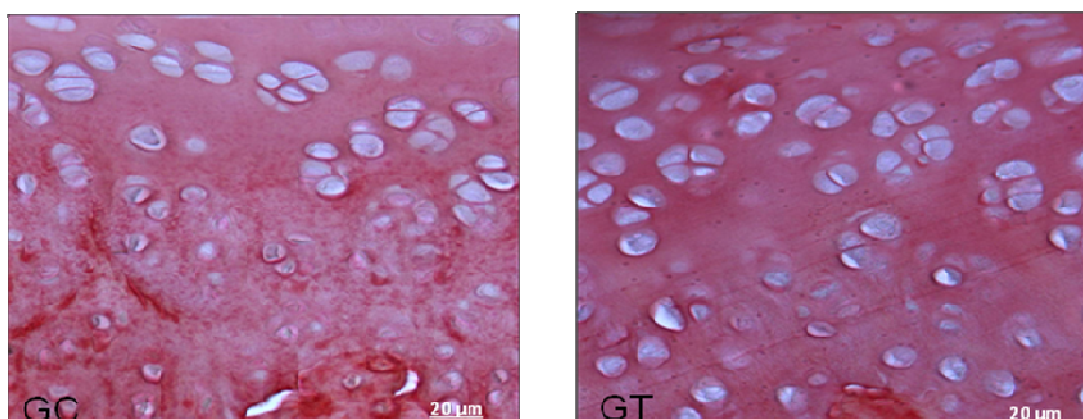


Figura 24 – Fotomicrografias da cartilagem articular do grupo controle (GC) e grupo treinado (GT) coradas com *Picro-Sirius-Red*. Aumento 40x.

Não houve diferença estatisticamente significativa da positividade do colágeno das diferentes áreas da cartilagem articular, linha epifisial e osso entre o GC e o GT.

6- DISCUSSÃO

A pergunta que motivou a realização deste trabalho foi se o exercício excessivo causa osteoartrose. Avaliando esse mesmo tópico, diversos autores discorreram sobre as relações existentes entre o exercício, a cartilagem e a osteoartrose.

Atualmente, encontra-se bem estabelecido o conceito que exercícios leves e moderados são benéficos para cartilagem e devem ser incluídos no tratamento da osteoartrose.

KIVIRANTA *et al.* (1988); GALOIS *et al.*(2004), TIDERIUS *et al.* (2004), ROOS e DAHLBERG (2005), FERRETTI *et al.* (2006), HELMARK *et al.* (2011) demonstram que o exercício leve, moderado e o estímulo mecânico acarretam um efeito protetor na cartilagem articular, aumentando a quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs), diminuindo e retardando o processo de morte celular e degeneração, além de diminuir a atividade de citocinas inflamatórias. Já nosso estudo demonstrou resultados diferentes em que o exercício excessivo levou a uma importante depleção do conteúdo de GAG da cartilagem articular e ao aumento da morte celular.

A prática de atividade física e os exercícios são tidos, nos dias atuais, como parte integrante e fundamental do tratamento da osteoartrose, contribuindo para uma melhora da dor e capacidade funcional por meio do fortalecimento muscular com protocolos de força e resistência, como demonstram ETTINGER *et al.* (1997), RODDY *et al.* (2005), FRANSEN e McCONNELL (2008), JAMTVEDT *et al.*(2008), LUND *et al.* (2008), ZHANG *et al.* (2008) e BOSOMWORTH (2009).

Também é evidenciado um efeito protetor, através de uma menor diminuição do espaço articular do joelho no acompanhamento de radiografias de pacientes com osteoartrose inseridos em um protocolo de fortalecimento muscular (MIKESKY *et al.*; 2006).

A dúvida que ainda permanece na literatura é em relação aos exercícios excessivos e suas conseqüências para a cartilagem. Muitos trabalhos, como os de SOHN e MICHELI (1985), PANUSH *et al.* (1986), HANNAN *et al.* (1993), LANE *et al.* (1993), LANE *et al.* (1998), BUCKWALTER e MARTIN (2004), CYMET e SINKOV (2006), CHAKRAVARTY *et al.* (2008) e HUNTER e ECKSTEIN (2009) não demonstraram relação entre o exercício excessivo e a osteoartrose. No entanto, outros trabalhos, como os de KUJALA *et al.* (1995), SPECTOR *et al.* (1996), TEITZ e KILCOYNE (1998), McALINDON *et al.* (1999) e CHENG *et al.* (2000) estabeleceram uma relação do exercício excessivo com a osteoartrose.

Devido às implicações éticas, dificuldades técnicas e impossibilidade de aplicações de modelos pré-concebidos de estudos envolvendo a criação de lesão ou indução de um estado de doença *in vivo* em humanos, desenvolveu-se parte dos estudos experimentais com animais. Há muito já se utiliza modelos animais para melhor entendimento da fisiopatologia de diversas enfermidades, avaliação de novas drogas terapêuticas e estudo de diferentes estímulos sobre os diversos tipos de tecido, como por exemplo, o estresse mecânico sobre a cartilagem. Tomando-se sempre as devidas precauções de não se extrapolar as conclusões de estudos com animais para os seres humanos, muito conhecimento já foi adicionado às moléstias que afetam o homem e seu tratamento em virtude das analogias possibilitadas pelos estudos

com animais. Essas analogias, após o escrutínio da comunidade científica, são em parte acrescentadas ao arsenal de informação utilizada para recomendações, orientações e, em última instância, tratamento de seres humanos (LINDBLAD-TOH, 2004; PASTOUREAU, HUNZIKER, PELLETIER, 2010; POOLE *et al.*, 2010).

Com base nessa validade de informações geradas por estudos com animais, foi criado um protocolo de treinamento animal utilizando ratos para avaliar os efeitos do exercício excessivo nos diferentes tipos de tecido. Este protocolo foi denominado treinamento de *ultra-endurance* em ratos. O *ultra-endurance* é uma modalidade de exercício excessivo com duração maior do que quatro horas ou quando são percorridas distâncias superiores a 50 km segundo NOAKES *et al.*, (1990) e PETERS (2003). Neste protocolo, os animais em seu treino final de corrida até exaustão normalmente correm por mais de três horas e, ao fim de doze semanas, acabam tendo percorrido mais de 55 km. Essa distância percorrida e a duração final do exercício até exaustão são medidas de extrema grandeza para ratos e só foram conseguidas mediante o treinamento com melhora do condicionamento físico. Na literatura não foram identificados trabalhos com ratos percorrendo distâncias superiores àquelas aplicadas no nosso estudo em um mesmo intervalo de tempo sem que ocorresse queda da performance.

O protocolo acima mencionado foi desenvolvido pelo pós-graduando Victor Alexandre Ferreira Tarini e, devido à carência de estudos envolvendo a análise de amostras teciduais de indivíduos submetidos a exercícios extenuantes por períodos muito prolongados, como o *ultra-endurance*, os animais do trabalho tiveram diversos tecidos analisados, como músculo, tecido cerebral, tecido cardíaco, tecido renal e

cartilagem, justamente procurando-se avaliar os efeitos e conseqüências deste tipo de exercício e seu treinamento nos diferentes sistemas, agregando recursos e pesquisadores em um projeto central.

Este protocolo foi aplicado em nosso estudo visando avaliar os efeitos do exercício excessivo na cartilagem de uma articulação saudável, visto que a maioria dos modelos de indução de osteoartrose em ratos utiliza algum procedimento cirúrgico alterando a harmonia articular (MCDEVITT e MUIR, 1976; WILLIAMS *et al.*, 1982; PAP *et al.*, 1994; LOVÀSZ *et al.*, 1995; GUINGANP *et al.*, 1997; STOOP *et al.*, 2000; KARAHAN *et al.*, 2001; JANUSZ *et al.*, 2002; GUZMAN *et al.*, 2003; GALOIS *et al.*, 2004; JANUSZ *et al.* 2004 MOORE *et al.*, 2005; WANCKET *et al.*, 2005; BOVE *et al.*, 2006; HAYAMI *et al.*, 2006; KALBHEN, 2006; LIN, HUANG, CHAI, 2006; REZENDE *et al.*, 2006; APPLETON *et al.*, 2007; JEAN *et al.*, 2007; YEH *et al.*, 2008; YORIMITSU *et al.*, 2008; BARAGI *et al.*, 2009; FLANNERY *et al.*, 2009; KALFF *et al.*, 2010; CHOCKALINGAM *et al.*, 2011).

Os estudos de TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009) são uma exceção à utilização de procedimentos cirúrgicos para indução de osteoartrose em ratos. Assemelhando-se ao nosso trabalho, promoveram o exercício de corrida excessiva por meio de uma esteira com um dispositivo gerador de choque elétrico, ativado quando o animal permanecesse parado na parte de trás da esteira. Nesses dois estudos, os animais percorrem 30 km em seis semanas com uma inclinação de 5% da esteira. Diferentemente dos nossos resultados, os autores encontraram características marcantes de osteoartrose incluindo fibrilação, fissura vertical e erosão com perda de substância da cartilagem, o que corresponderia aos graus 2,3 e 4 da classificação histológica de

osteoartrose da *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI). Em nosso estudo o maior grau encontrado dessa classificação foi o 1.5, que corresponde à presença marcante de morte celular ainda com a superfície cartilaginosa intacta. Comparativamente, os fatores que poderiam justificar essa diferença seriam a inclinação de 5% da esteira, não utilizada no nosso trabalho e o aprimoramento mais gradual do condicionamento físico proporcionado com nosso protocolo. Nos estudos de TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009), os animais percorreram 30 km em seis semanas com uma inclinação de 5% da esteira, sendo realizada uma rápida progressão da carga de treino, já que em oito dias o exercício passou de uma velocidade de 10 m/min por 10 minutos para 20 m/min por 55 minutos, sendo os 10 primeiros minutos constituídos de um aquecimento a 12 m/min, mantendo-se esse padrão a partir do oitavo dia. Em nosso protocolo, os animais tiveram o aumento da velocidade e da duração dos exercícios de uma maneira mais paulatina, sendo que, apesar de percorrerem pelo menos 55 km ao término das 12 semanas, praticamente o dobro dos estudos supracitados, nas primeiras 6 semanas eram percorridos apenas 13 km aproximadamente, com os 42 km restantes percorridos nas últimas 6 semanas. Essa progressão mais gradual da carga de treinamento talvez possa estar relacionada a um melhor desenvolvimento da musculatura e condicionamento físico, protegendo a cartilagem de uma maneira mais eficaz no nosso estudo.

Poucos estudos, como os de TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009) avaliam a osteoartrose por corrida excessiva, sendo nesses identificadas alterações degenerativas importantes, mais avançadas do que em nosso trabalho, mesmo com nossos animais tendo percorrido distâncias maiores. Conforme demonstrado acima, atribuímos essa

diferença à introdução do conceito de aprimoramento gradual da treinabilidade, ou seja, segundo AOKI, BELMONTE E SEELAENDER (2003), é possível estabelecer uma relação direta entre o consumo de oxigênio (VO_2 máximo) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) suportada pelo animal. Com isso buscamos manter a intensidade do treinamento sempre próxima a 60% da $V_{m\acute{a}x}$, corrigindo-se as intensidades à medida que os animais se adaptavam a progressão do treino. Diferentemente do material existente na literatura que avalia a osteoartrose induzida pelo exercício excessivo em ratos, realizado com progressão incisiva e abrupta, nosso estudo introduz, de maneira inédita, um modelo desenvolvido com controle da intensidade de treinamento, visando ser mais fisiológico e aprimorando com isso o entendimento dos efeitos do exercício excessivo na cartilagem de uma articulação sadia.

A discrepância de relações do exercício excessivo com osteoartrose é encontrada tanto nos estudos em humanos como também nos estudos em animais. KIVIRANTA *et al.* (1992), AROKOSKI *et al.* (1993), AROKOSKI *et al.* (1994), SÄÄMÄMEN *et al.* (1994) e AROKOSKI *et al.* (1996), em seus estudos de corrida excessiva com cães, não conseguiram evidenciar claramente o desenvolvimento de osteoartrose nos animais, apesar de já demonstrarem uma diminuição localizada do GAG da cartilagem articular nas regiões de maior carga. NEWTON *et al.* (1997) também não conseguiram demonstrar osteoartrose no seu estudo de exercício por tempo prolongado em cães carregando peso por toda a vida. Já PAP *et al.*, (1998), realizando estudos de corrida excessiva com ratos por meio de estimulação intracraniana, contemplaram sinais de osteoartrose em graus mais avançados do que nos referidos estudos com cães. Seu protocolo de corrida totalizava 30 km em

12 semanas. Utilizando um princípio semelhante ao nosso estudo, TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009), conforme já citado, também conseguiram desenvolver osteoartrose em graus mais avançados com protocolos de corridas com ratos, totalizando 30 km em seis semanas em esteiras inclinadas a 5%. Nosso estudo demonstrou um padrão de resultados intermediário de osteoartrose. Estes resultados são mais pronunciados do que nos estudos de KIVIRANTA *et al.* (1992), AROKOSKI *et al.* (1993), AROKOSKI *et al.* (1994), SÄÄMÄMEN *et al.* (1994) e AROKOSKI *et al.* (1996) e menos evidentes do que nos estudos de PAP *et al.*, (1998) , TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009).

Escolhemos os ratos para este estudo experimental por serem animais de fácil manuseio e pequeno porte, o que facilita e diminui as despesas com manutenção, além de já possuírem seu genoma mapeado e apresentarem similaridades marcantes com os seres humanos, como por exemplo a taxa de 75% de similaridade entre as seqüências de aminoácidos dos agregans, conforme evidenciaram DOEGE *et al.*(1991) e LINDBLAD-TOH, (2004). Como os animais imaturos parecem ter uma melhor capacidade de recuperação das lesões articulares, optamos por utilizar ratos que atingiram a maturidade esquelética, tendo, portanto, mais de 12 semanas de idade. Com isso esperamos alcançar resultados mais fidedignos dos efeitos do exercício em uma cartilagem de um indivíduo esqueleticamente maturo. Entretanto, esses animais tem uma peculiaridade, mesmo os ratos que já atingiram a maturidade esquelética não apresentam todas as placas de crescimento fechadas, e, apesar do crescimento ósseo longitudinal ter cessado, eles ainda têm potencial para esse tipo de crescimento. Apesar dessa particularidade, essa característica

ainda não foi relatada como fator de viés nos vários estudos em ratos para as mais diversas finalidades, incluindo as avaliações ósseas e de cartilagem (PASTOUREAU, HUNZIKER, PELLETIER, 2010; POOLE *et al.*, 2010).

Na avaliação histomorfológica observamos uma resposta da cartilagem ao exercício demonstrada pelo aumento do número de condrócitos, tanto na área de carga, quanto na área de não carga, com exceção da zona profunda desta última. Este aumento na celularidade é representativo de uma tentativa de reparo como resposta ao estresse, já que essas células são capazes de responder a forças mecânicas e pequenas alterações estruturais na matriz extracelular (GOLDRING e GOLDRING, 2007; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008; GOLDRING e GOLDRING, 2010).

O aumento do número de condrócitos, tanto na área de carga, como também na área de não carga, demonstra que essas células são responsivas a micro e macro alterações biomecânicas na matriz extracelular, constituídas de inúmeros mecanismos de sinalização, que afetam tanto a região da cartilagem diretamente submetida ao estresse, quanto as regiões da cartilagem mais distantes desse estímulo mecânico direto (LEE e BADER, 1997; IKENOUE *et al.*, 2003; SHELTON, BADER e LEE, 2003; SEIDEL *et al.*, 2004; BLAIN, 2007; KAMIYA *et al.*, 2010; SUN, 2010).

O aumento do número de condrócitos presente em todas as zonas da cartilagem articular na área de carga e presente apenas nas zonas superficial e intermediária da área de não carga demonstra uma maior resposta da cartilagem ao estresse na área de carga, conforme

demonstrado também por outros trabalhos como KIVIRANTA *et al.* (1992), AROKOSKI *et al.* (1993) e AROKOSKI *et al.* (1994).

O aumento dos pares de clones de condrócitos ou *clusters* em consequência ao exercício excessivo, no nosso estudo, demonstra uma proliferação aguda ou sustentada, já que uma celularidade aumentada sem o encontro marcante destes pares de clones não indicaria a presença atual dessa resposta. A formação e aumento dos *clusters* é uma característica anormal da cartilagem, presente em condições como a osteoartrose, sendo considerada uma das suas maiores características fenotípicas (MANKIN *et al.*, 1971 e POOLE, 1997). Os *clusters*, apesar de não estarem completamente associados com a degeneração da cartilagem, são freqüentemente encontrados em regiões de osteoartrose, geralmente adjacentes a áreas com fissuras e fibrilações, sendo indicativos de uma resposta ao estresse. Eles são mais freqüentes na zona intermediária, o que também foi evidenciado em nosso estudo, onde as células não mais se apresentam sob a forma de colunas ordenadas de *chondrons*, mas em agrupamentos de células semelhantes a cachos, os *clusters*. Ainda não se sabe ao certo se eles representam uma tentativa de repopular o tecido e aumentar a síntese da matriz extracelular ou se eles representam uma reversão para um estágio evolutivo anterior, já que exibem características de hipertrofia celular como a expressão de fosfatases alcalinas e colágeno tipo X, que, por sua vez, são características do estágio final de condrócitos da placa de crescimento. Os *clusters* também podem ser uma consequência de alterações celulares que reduzem a habilidade da cartilagem em produzir tecido de reparação normal (REES e ALI, 1988; VON DER MARK *et al.*, 1992; SILVER, BRADICA, TRIA, 2004; QUINTAVALLA *et al.*, 2005).

Os estudos em animais proporcionaram o entendimento da progressão da osteoartrose que costuma seguir um mesmo padrão caracterizado pelo aumento dos pares de clones de condrócitos como resultado da proliferação celular e aumento da atividade anabólica dos condrócitos elevando a produção de componentes da matriz extracelular. À medida que esse processo continua, aumenta a atividade catabólica relacionada à produção de substâncias deletérias acarretando a perda gradual dos proteoglicanos, seguida pela degradação do colágeno (GOLDRING e GOLDRING, 2010).

Para estudar histologicamente a cartilagem, foram propostas várias classificações ao longo dos anos. Cada uma possui vantagens e desvantagens em relação às outras e geralmente são associadas a três grandes campos de estudo: estudos de osteoartrose, estudos de reparo de cartilagem *in vivo* e estudos de engenharia tecidual *in vitro*. Dentre as classificações utilizadas para o estudo da osteoartrose, conforme sugere RUTGERS *et al.* (2010) ao discorrer sobre os diferentes sistemas de avaliação histológica da cartilagem, destacam-se a de Mankin ou HHGS-*Histological-Histochemical Grading System*, desenvolvida por MANKIN *et al.*, (1971) e a classificação OARSI - *Osteoarthritis Research Society International*, desenvolvida por PRITZKER *et al.* (2006). Em nosso estudo, optamos pela utilização da classificação OARSI por ser mais indicada quando se deseja avaliar alterações mais sutis.

No grupo controle (GC), encontramos a maior parte dos animais pertencentes ao grau 0 (cartilagem normal), mas também alguns pertencentes ao grau 1 (presença marcante de *clusters*) da classificação OARSI. No grupo treinado (GT), a maior parte foi classificada como grau 1.5 (presença marcante de células com aspecto irregular que

denotam morte celular como encolhimento do citoplasma, aspecto de lacunas vazias, fragmentação do núcleo ou aspecto de membrana fantasma) (KUHN *et al.*, 2004). Em nenhum animal foi percebida a descontinuidade da superfície articular, diferentemente dos estudos de PAP *et al.* (1998), TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009).

A classificação em grau 1.5 apenas no GT demonstra o aumento da morte celular como resposta ao exercício excessivo. A morte celular pode ser induzida por estresse mecânico, perda da matriz extracelular e perda de fatores de crescimento entre outras causas. Em termos de resposta biológica, a morte celular e a diminuição dos GAGs sulfatados são alterações degenerativas precoces que levam à deterioração das funções da cartilagem já demonstrando um desequilíbrio a favor do catabolismo (KUHN *et al.*, 2004; NATOLI e ATHANASIOU, 2009; ALMONTE-BECERRIL *et al.*, 2010).

Os resultados do nosso estudo não demonstraram alteração da espessura da cartilagem articular com o modelo de exercício excessivo imposto aos animais, diferentemente de KIVIRANTA *et al.* (1988), que demonstraram um aumento da espessura da cartilagem com exercícios moderados em cães e PAP *et al.* (1998), TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009), que demonstram até mesmo erosão da cartilagem com perda da matriz e conseqüente diminuição da espessura da cartilagem.

Devido à peculiaridade dos ratos permanecerem com potencial para crescimento ósseo longitudinal mesmo após a maturidade por ausência de fechamento completo de todas as placas de crescimento ou linhas epifisiais, conforme cita POOLE *et al.*, (2010), investigamos a espessura e porcentagem de glicosaminoglicanos sulfatados das linhas epifisiais dos animais tentando correlacionar os dados com alterações da

cartilagem articular. No entanto, não encontramos relação estatisticamente significativa já que não houve diferença expressiva entre o GC e GT.

A análise quantitativa digital da porcentagem de GAG sulfatado por técnica histoquímica com *Alcian-Blue* pH 0,5 foi realizada com o programa de computador *ImageLab*. Apesar de mais acurado que o método semi-quantitativo de HAIGH e SCOTT (1986) e KLEIN *et al.* (2001), conforme apontaram MATOS *et al.* (2006), não encontramos diferenças significantes entre o GC e GT, quando utilizamos esta técnica, porém devemos ressaltar que essa técnica demonstra os GAGs sulfatados e também as glicoproteínas sulfatadas, não sendo portanto, tão específica. Já a quantificação dos GAGs sulfatados pela densitometria da eletroforese demonstrou diferenças importantes comprovadas estatisticamente entre os dois grupos, sendo uma técnica mais específica do que a primeira por avaliar realmente os GAGs sulfatados. Enquanto na eletroforese ocorreu a separação dos GAGs sulfatados das glicoproteínas sulfatadas por meio da digestão com protease e β -eliminação, na análise com *Alcian-Blue* pH 0,5, foram visualizados ambos os componentes.

O estudo eletroforético demonstrou que o condroitim sulfato foi o GAG sulfatado mais encontrado na cartilagem articular de ambos os grupos de ratos do nosso estudo, além disso a quantificação dos GAGs sulfatados por densitometria demonstrou que o GT apresentou uma quantidade muito menor do que o GC.

Nosso estudo evidenciou uma diminuição da concentração dos GAGs sulfatados da cartilagem após a realização do exercício excessivo com o protocolo de *ultra-endurance* nos ratos. Este achado diferencia-se do fator protetor estabelecido com exercícios moderados que elevaram a

concentração dos GAGs nos trabalhos de KIVIRANTA *et al.* (1988); GALOIS *et al.*(2004), TIDERIUS *et al.* (2004), ROOS e DAHLBERG (2005).

Já nos estudos de KIVIRANTA *et al.* (1992), AROKOSKI *et al.* (1993), AROKOSKI *et al.* (1994), SÄÄMÄMEN *et al.* (1994), PAP *et al.* (1998), TANG *et al.* (2008) e SEKIYA *et al.* (2009) o exercício excessivo também resultou em uma diminuição da concentração de GAGs da cartilagem articular, à semelhança do nosso trabalho.

Os GAGs são moléculas com cargas aniônicas que estabelecem a natureza carregada da matriz extracelular e fazem as cadeias laterais dos glicosaminoglicanos constituintes dos proteoglicanos se repelirem mutuamente mantendo as moléculas em estado de extensão. Eles atraem e capturaram os íons H⁺ da água e o íon sódio, tornando o tecido extremamente hidrofílico e outorgando à matriz extracelular propriedades análogas àquelas de uma esponja molecular conferindo-lhe alta resistência às forças de compressão (ROUGHLEY e WHITE, 1980; KJELLÉN e LINDAHL, 1991; LU e MOW, 2008; JACKSON e GU, 2009).

As forças incidentes na cartilagem afetam o balanço entre o anabolismo e o catabolismo, sendo que as alterações das propriedades mecânicas da cartilagem são associadas com a degeneração e destruição do tecido, alterando a transdução mecânica dos condrócitos após uma perda da tensão intrínseca da zona superficial. Essas alterações na transdução também são consequência de mudanças do estresse mecânico dentro da própria estrutura interna da cartilagem por modificações em sua composição. O comportamento da curva de um gráfico representando a relação entre estresse elástico e *strain* é dependente da taxa de *strain*

devido à presença de grandes quantidades de proteoglicanos que protegem a cartilagem aumentando sua rigidez aparente. O aumento da rigidez aparente da cartilagem quando submetida a altas taxas de *strain*, protege o tecido contra a degeneração por sobrecarga. Uma vez alterada a tensão da zona superficial por sobrecarga mecânica, a tensão é diminuída em todas as zonas da cartilagem articular acarretando um aumento na carga compressiva incidente nos condrócitos que gera uma elevação da mecano transdução de processos catabólicos mediados por enzimas. Essas alterações são verificadas em nosso estudo, uma vez que o exercício excessivo levou a diminuição das concentrações de GAG acarretando em uma deterioração da rigidez da cartilagem (SILVER e BRADICA, 2002; SILVER, BRADICA, TRIA, 2004; NATOLI e ATHANASIOU, 2009).

Sabemos, conforme já mencionado na discussão da morte celular sustentada por NATOLI e ATHANASIOU (2009), que, em termos de resposta biológica, a morte celular e a diminuição dos GAGs sulfatados são alterações degenerativas precoces que levam à deterioração das funções da cartilagem, já demonstrando um desequilíbrio a favor do catabolismo, o que coloca nossos animais do GT em uma situação de degeneração catabólica gerada pelo exercício excessivo.

Quando se fala em degeneração, também faz-se necessário estudar o equilíbrio dessa condição com sua antagonista, a regeneração. A partir do momento em que a degeneração supera a regeneração e o equilíbrio não consegue mais ser restabelecido, estamos diante de uma alteração irreversível. Na literatura, é bem estabelecido nas condições degenerativas da cartilagem que a depleção dos GAGs é normalmente uma situação reversível quando sua perda não é exagerada. No entanto, a

degradação do colágeno, a não ser em pequenas quantidades, constitui uma situação irreversível. A degradação da cartilagem também se mostra reversível quando estão envolvidas nesse processo apenas as agrecanases. Já quando as metaloproteinases de matriz (MMPs) induzem a degradação dos agracanos e colágeno tipo II, os condrócitos perdem substancialmente sua capacidade de reparo corroborando com o conceito de reversibilidade de um processo envolvendo a degradação apenas dos GAGs e com a irreversibilidade dos processos envolvendo a degradação do colágeno (BEHRENS, KRAFT, OEGEMA, 1989; STOOP *et al.*, 1999; VAN MEURS *et al.*, 1999; KARSDAL *et al.*, 2008).

Apesar da degradação dos GAGs ser reversível quando não for demasiada avançada, nem sempre a concentração desses componentes retorna a seu nível basal, como demonstram SAAMANEM *et al.* (1990) e HAAPALA *et al.* (1999), o que coloca em dúvida o conceito de reversibilidade, uma vez que essa pode ser apenas parcial.

O ácido hialurônico (AH) é um GAG não sulfatado de grande comprimento. Suas funções são reter água e regular seu fluxo no tecido, além de proteger e lubrificar as articulações devido a sua alta viscosidade. O AH também exerce um papel multifatorial de acordo com seu grau de polimerização, sendo que o AH com baixo peso molecular exerce um efeito pró-inflamatória e o AH com alto peso molecular exerce um efeito anti-inflamatório, conforme sugerem WANG *et al.* (2006), CAMPO *et al.*, (2010) e JULOVI *et al.* (2011) em estudos com AH exógeno.

Em nosso estudo, obtivemos uma menor concentração de AH no GT em relação ao GC após sua quantificação pelo ensaio fluorimétrico

não competitivo tipo ELISA, sendo este resultado corroborado pela menor intensidade de coloração do AH na cartilagem articular do GT após sua detecção histoquímica. Isso demonstra que o exercício a que submetemos os animais exerceu uma função catabólica sobre o AH. Este resultado está de acordo com o recente trabalho de TANIMOTO *et al.* (2010). Nesse trabalho é demonstrado que a expressão gênica de hialuronidases, enzimas que degradam o AH, é aumentada pelo estímulo mecânico excessivo, sendo também influenciada pela interleucina 1- β (IL1- β), levando a um catabolismo do AH na cartilagem articular.

A depleção do AH diminui a lubrificação e o poder hidrofílico da cartilagem, deteriorando sua função de esponja molecular e conseqüentemente sua capacidade de resistência às forças de compressão, fragilizando esse tecido já deteriorado e tornando-o ainda mais suscetível a novas lesões (BELL, INGHAM, FISHER, 2006; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008; TANIMOTO *et al.* 2010).

Nossa análise do colágeno com *Picro-Sirius-Red* na microscopia de luz não demonstrou diferenças entre os dois grupos avaliados, porém constitui-se em um método semi-quantitativo sem a utilização de luz polarizada e, portanto, pode não ter detectado alterações já existentes devido às limitações do método (RIEPPPO *et al.*, 2008).

Como perspectivas futuras, pretendemos continuar nossos estudos com este protocolo de treinamento buscando avaliar qual o ponto de reversibilidade da lesão. Pretendemos confirmar e qualificar o processo de morte celular encontrado em nossos animais do GT utilizando marcadores de necrose, como anticorpos para IL-1 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e de marcadores de apoptose, como a caspase. Também investigaremos se o AH presente no GT é de alto ou baixo peso

molecular por meio da investigação com *polymerase chain reaction* (PCR) em torno da expressão de *hyaluronan synthase* (HAS), já que a HAS tipo 1 e 2 produzem AH de baixo peso molecular e a HAS tipo 3 produz AH de alto peso molecular. Como houve uma diminuição do AH, acreditamos que o AH presente no GT seja de baixo peso molecular. Além disso, objetivamos aprofundar nossa avaliação do colágeno por meio da microscopia de luz polarizada.

7 - CONCLUSÃO

A cartilagem articular dos ratos treinados submetidos ao exercício de *ultra-endurance* demonstrou alterações predisponentes do processo osteoartrósico através de modificações celulares patológicas como aumento dos pares de clones de condrócitos e aumento da quantidade de condrócitos com características de morte celular, além da diminuição expressiva de componentes da matriz extracelular como os glicosaminoglicanos sulfatados e o ácido hialurônico.

8 - REFERÊNCIAS

1. Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalle C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis*. 2010 May;15(5):631-8
2. Aoki MS, Belmonte MA, Seelaender MCL. Influência da suplementação lipídica sobre a indução do efeito poupador de glicogênio em ratos submetidos ao exercício de endurance. *Rev Paul Educ Fis* 2003;17:93-103
3. Arokoski JP, Hyttinen MM, Lapveteläinen T, Takács P, Kosztáczky B, Módis L, Kovanen V, Helminen H. Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training, detected by quantitative polarised light microscopy. *Ann Rheum Dis*. 1996 Apr;55(4):253-64.
4. Arokoski J, Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi M, Helminen HJ. Softening of the lateral condyle articular cartilage in the canine knee joint after long distance (up to 40 km/day) running training lasting one year. *Int J Sports Med*. 1994 Jul;15(5):254-60.
5. Arokoski J, Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Helminen HJ. Long-distance running causes site-dependent decrease of cartilage glycosaminoglycan content in the knee joints of beagle dogs. *Arthritis Rheum*. 1993 Oct;36(10):1451-9.
6. Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, Holdsworth DW, Beier F. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):R13

7. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, Boer J, Deng H, Dodd R, Essers M, Feuerstein T, Gallagher BM Jr, Gege C, Hochgürtel M, Hofmann M, Jaworski A, Jin L, Kiely A, Korniski B, Kroth H, Nix D, Nolte B, Piecha D, Powers TS, Richter F, Schneider M, Steeneck C, Sucholeiki I, Taveras A, Timmermann A, Van Veldhuizen J, Weik J, Wu X, Xia B. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):2008-18.
8. Behrens F, Kraft EL, Oegema TR Jr. Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. *J Orthop Res.* 1989;7(3):335-43.
9. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001 Jun;1(4):363-76.
10. Bell CJ, Ingham E, Fisher J. Influence of hyaluronic acid on the time-dependent friction response of articular cartilage under different conditions. *Proc Inst Mech Eng H.* 2006 Jan;220(1):23-31.
11. Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, Kaufman J, Reginster JY, Rozenberg S. Loading and skeletal development and maintenance. *J Osteoporos.* 2010 Dec 20;2011:786752
12. Blain EJ. Mechanical regulation of matrix metalloproteinases. *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:507-27.
13. Bosomworth NJ. Exercise and knee osteoarthritis: benefit or hazard? *Can Fam Physician.* 2009 Sep;55(9):871-8.

-
14. Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, Osborn MN, Sanchez BM, Guzman RE, Hook KE, Juneau PL, Connor JR, Kilgore KS. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Oct;14(10):1041-8.
 15. Buckwalter JA, Martin JA. Sports and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Sep;16(5):634-9.
 16. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 May 20;58(2):150-67. Epub 2006 Mar 13.
 17. Bullough PG. The role of joint architecture in the etiology of arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12 Suppl A:S2-9.
 18. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Rugolo CA, Calatroni A. Differential effect of molecular mass hyaluronan on lipopolysaccharide-induced damage in chondrocytes. *Innate Immun*. 2010 Feb;16(1):48-63.
 19. Carlson DM. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J Biol Chem*. 1968 Feb 10;243(3):616-26.
 20. Carter DR, Beaupré GS, Wong M, Smith RL, Andriacchi TP, Schurman DJ. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Oct;(427 Suppl):S69-77.
 21. Civinini R, Carulli C, Matassi F, Villano M, Innocenti M. Total knee arthroplasty after complex tibial plateau fractures. *Chir Organi Mov*. 2009 Dec;93(3):143-7.

-
22. Chakravarty EF, Hubert HB, Lingala VB, Zatarain E, Fries JF. Long distance running and knee osteoarthritis. A prospective study. *Am J Prev Med.* 2008 Aug;35(2):133-8.
 23. Chen CT, Burton-Wurster N, Lust G, Bank RA, Tekoppele JM. Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent. *J Orthop Res.* 1999 Nov;17(6):870-9.
 24. Chen CT, Burton-Wurster N, Borden C, Hueffer K, Bloom SE, Lust G. Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J Orthop Res.* 2001 Jul;19(4):703-11.
 25. Cheng Y, Macera CA, Davis DR, Ainsworth BE, Troped PJ, Blair SN. Physical activity and self-reported, physician-diagnosed osteoarthritis: is physical activity a risk factor? *J Clin Epidemiol.* 2000 Mar 1;53(3):315-22
 26. Chockalingam PS, Sun W, Rivera-Bermudez MA, Zeng W, Dufield DR, Larsson S, Lohmander LS, Flannery CR, Glasson SS, Georgiadis KE, Morris EA. Elevated aggrecanase activity in a rat model of joint injury is attenuated by an aggrecanase specific inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011 Mar;19(3):315-23.
 27. Cohen M, Amaro JT, Ejnisman B, Carvalho RT, Nakano KK, Peccin MS, Teixeira R, Laurino CF, Abdalla RJ. Anterior cruciate ligament reconstruction after 10 to 15 years: association between meniscectomy and osteoarthrosis. *Arthroscopy.* 2007 Jun;23(6):629-34.
 28. Croft P, Coggon D, Cruddas M, Cooper C. Osteoarthritis of the hip: an occupational disease in farmers. *BMJ.* 1992 May 16;304(6837):1269-72.

-
29. Cymet TC, Sinkov V. Does long-distance running cause osteoarthritis? *J Am Osteopath Assoc.* 2006 Jun;106(6):342-5.
 30. Dietrich CP, Dietrich SM. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem.* 1976 Feb;70(2):645-7.
 31. Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 1991 Jan 15;266(2):894-902.
 32. Ehrlich MG, Mankin HJ, Jones H, Grossman A, Crispen C, Ancona D. Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model. *J Bone Joint Surg Am.* 1975 Apr;57(3):392-6.
 33. Ettinger WH Jr, Burns R, Messier SP, Applegate W, Rejeski WJ, Morgan T, Shumaker S, Berry MJ, O'Toole M, Monu J, Craven T. A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise with a health education program in older adults with knee osteoarthritis. The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST). *JAMA.* 1997 Jan 1;277(1):25-31.
 34. Felson DT, Hannan MT, Naimark A, Berkeley J, Gordon G, Wilson PW, Anderson J. Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol.* 1991 Oct;18(10):1587-92.
 35. Ferretti M, Srinivasan A, Deschner J, Gassner R, Baliko F, Piesco N, Salter R, Agarwal S. Anti-inflammatory effects of continuous

-
- passive motion on meniscal fibrocartilage. *J Orthop Res.* 2005 Sep;23(5):1165-71.
36. Ferretti M, Gassner R, Wang Z, Perera P, Deschner J, Sowa G, Salter RB, Agarwal S. Biomechanical signals suppress proinflammatory responses in cartilage: early events in experimental antigen-induced arthritis. *J Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8757-66.
37. Flannery CR, Zollner R, Corcoran C, Jones AR, Root A, Rivera-Bermúdez MA, Blanchet T, Gleghorn JP, Bonassar LJ, Bendele AM, Morris EA, Glasson SS. Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar;60(3):840-7.
38. Fransen M, McConnell S. Exercise for osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8;(4):CD004376.
39. Gabay O, Hall DJ, Berenbaum F, Henrotin Y, Sanchez C. Osteoarthritis and obesity: experimental models. *Joint Bone Spine.* 2008 Dec;75(6):675-9.
40. Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Loeuille D, Netter P, Mainard D, Gillet P. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Oct;12(10):779-86.
41. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007 Dec;213(3):626-34.
42. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1192:230-7.

-
43. Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1670-9.
 44. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol.* 2003 Nov-Dec;31(6):619-24.
 45. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A. Habitual physical activity is not associated with knee osteoarthritis: the Framingham Study. *J Rheumatol.* 1993 Apr;20(4):704-9.
 46. Haapala J, Lammi MJ, Inkinen R, Parkkinen JJ, Agren UM, Arokoski J, Kiviranta I, Helminen HJ, Tammi MI. Coordinated regulation of hyaluronan and aggrecan content in the articular cartilage of immobilized and exercised dogs. *J Rheumatol.* 1996 Sep;23(9):1586-93.
 47. Haapala J, Arokoski JP, Hyttinen MM, Lammi M, Tammi M, Kovanen V, Helminen HJ, Kiviranta I. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 May;(362):218-29.
 48. Haapala J, Arokoski J, Pirttimäki J, Lyyra T, Jurvelin J, Tammi M, Helminen HJ, Kiviranta I. Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization. *Int J Sports Med.* 2000 Jan;21(1):76-81.

-
49. Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Saijo Y, Ohmori-Matsuda K, Itoi E. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. *J Orthop Res.* 2009 Feb;27(2):236-42.
 50. Haigh M, Scott JE. A method of processing tissue sections for staining with cu-promeronic blue and other dyes, using CEC techniques, for light and electron microscopy. *Basic Appl Histochem.* 1986;30(4):479-86.
 51. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong le T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone.* 2006 Feb;38(2):234-43.
 52. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum.* 2009 Oct;39(2):71-80.
 53. Holmes MW, Bayliss MT, Muir H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J.* 1988 Mar 1;250(2):435-41.
 54. Honkonen SE. Degenerative arthritis after tibial plateau fractures. *J Orthop Trauma.* 1995;9(4):273-7.
 55. Helmark IC, Petersen MC, Christensen HE, Kjaer M, Langberg H. Moderate loading of the human osteoarthritic knee joint leads to lowering of intraarticular cartilage oligomeric matrix protein. *Rheumatol Int.* 2011 Jan 19.
 56. Hunter DJ, Eckstein F. Exercise and osteoarthritis. *J Anat.* 2009 Feb;214(2):197-207.

-
57. Ikenoue T, Trindade MC, Lee MS, Lin EY, Schurman DJ, Goodman SB, Smith RL. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J Orthop Res.* 2003 Jan;21(1):110-6.
 58. Jackson A, Gu W. TRANSPORT PROPERTIES OF CARTILAGINOUS TISSUES. *Curr Rheumatol Rev.* 2009 Feb 1;5(1):40-50.
 59. Jamtvedt G, Dahm KT, Christie A, Moe RH, Haavardsholm E, Holm I, Hagen KB. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews. *Phys Ther.* 2008 Jan;88(1):123-36.
 60. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Oct;10(10):785-91.
 61. Janusz MJ, Little CB, King LE, Hookfin EB, Brown KK, Heitmeyer SA, Caterson B, Poole AR, Taiwo YO. Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neoepitopes in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Sep;12(9):720-8.
 62. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH, Wong CS. Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Jun;15(6):638-45.

-
63. Julovi SM, Ito H, Nishitani K, Jackson CJ, Nakamura T.
Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and P38. *J Orthop Res.* 2011 Feb;29(2):258-64.
 64. Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi M, Helminen JH. Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Jun;(207):246-52.
 65. Kalbhen DA. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol.* 1987 May;14 Spec No:130-1.

 66. Kalff KM, El Mouedden M, van Egmond J, Veening J, Joosten L, Scheffer GJ, Meert T, Vissers K. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *Eur J Pharmacol.* 2010 Sep 1;641(2-3):108-13.
 67. Kamiya T, Tanimoto K, Tanne Y, Lin YY, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K. Effects of mechanical stimuli on the synthesis of superficial zone protein in chondrocytes. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Feb;92(2):801-5.
 68. Karahan S, Kincaid SA, Kammermann JR, Wright JC. Evaluation of the rat stifle joint after transection of the cranial cruciate ligament and partial medial meniscectomy. *Comp Med.* 2001 Dec;51(6):504-12.
 69. Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):R63.

-
70. Kawakami M, Suzuki K, Matsuki Y, Ishizuka T, Hidaka T, Konishi T, Matsumoto M, Kataharada K, Nakamura H. Hyaluronan production in human rheumatoid fibroblastic synovial lining cells is increased by interleukin 1 beta but inhibited by transforming growth factor beta 1. *Ann Rheum Dis.* 1998 Oct;57(10):602-5.
 71. Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Arokoski J, Säämänen AM, Helminen HJ. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the canine knee joint after strenuous running exercise. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Oct;(283):302-8.
 72. Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Säämänen AM, Helminen HJ. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J Orthop Res.* 1988;6(2):188-95.
 73. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:443-75.
 74. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, Leclère J, Duprez A, Weryha G. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):656-8.
 75. Kühn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Jan;12(1):1-16.
 76. Kujala UM, Kettunen J, Paananen H, Aalto T, Battié MC, Impivaara O, Videman T, Sarna S. Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum.* 1995 Apr;38(4):539-46

-
77. Kuroda T, Matsumoto T, Mifune Y, Fukui T, Kubo S, Matsushita T, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R. Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Ups J Med Sci.* 2011 Feb 28.
78. Kurz B, Jin M, Patwari P, Cheng DM, Lark MW, Grodzinsky AJ. Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J Orthop Res.* 2001 Nov;19(6):1140-6
79. Lane NE, Michel B, Bjorkengren A, Oehlert J, Shi H, Bloch DA, Fries JF. The risk of osteoarthritis with running and aging: a 5-year longitudinal study. *J Rheumatol.* 1993 Mar;20(3):461-8.
80. Lane NE, Oehlert JW, Bloch DA, Fries JF. The relationship of running to osteoarthritis of the knee and hip and bone mineral density of the lumbar spine: a 9 year longitudinal study. *J Rheumatol.* 1998 Feb;25(2):334-41.
81. Lee DA, Bader DL. Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. *J Orthop Res.* 1997 Mar;15(2):181-8.
82. Lindblad-Toh K. Genome sequencing: three's company. *Nature.* 2004 Apr 1;428(6982):475-6.
83. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, Nuttall ME, Hung HH, Blake SM, Grodzinsky AJ, Lark MW. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Sep 15;381(2):205-12.

-
84. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Aug;17(8):971-9.
 85. Lozoya KA, Flores JB. A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathol Res Pract*. 2000;196(11):729-45.
 86. Lu XL, Mow VC. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc*. 2008 Feb;40(2):193-9.
 87. Lund H, Weile U, Christensen R, Rostock B, Downey A, Bartels EM, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H. A randomized controlled trial of aquatic and land-based exercise in patients with knee osteoarthritis. *J Rehabil Med*. 2008 Feb;40(2):137-44
 88. Magnusson SP, Hansen M, Langberg H, Miller B, Haraldsson B, Westh EK, Koskinen S, Aagaard P, Kjaer M. The adaptability of tendon to loading differs in men and women. *Int J Exp Pathol*. 2007 Aug;88(4):237-40.
 89. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971 Apr;53(3):523-37.
 90. Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006 Oct;61(5):417-24.

-
91. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008 Apr;22(2):351-84.
 92. Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem*. 2003 Aug 1;319(1):65-72.
 93. McAlindon TE, Wilson PW, Aliabadi P, Weissman B, Felson DT. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham study. *Am J Med*. 1999 Feb;106(2):151-7
 94. Mikesky AE, Mazzuca SA, Brandt KD, Perkins SM, Damush T, Lane KA. Effects of strength training on the incidence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Oct 15;55(5):690-9.
 95. Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggle KS, Reardon B, Ellsworth JL. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Jul;13(7):623-31.
 96. Morel V, Quinn TM. Cartilage injury by ramp compression near the gel diffusion rate. *J Orthop Res*. 2004 Jan;22(1):145-51
 97. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*. 1992;13:67-97

-
98. Natoli RM, Athanasiou KA. Traumatic loading of articular cartilage: Mechanical and biological responses and post-injury treatment. *Biorheology*. 2009;46(6):451-85.
 99. Newton PM, Mow VC, Gardner TR, Buckwalter JA, Albright JP. Winner of the 1996 Cabaud Award. The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. *Am J Sports Med*. 1997 May-Jun;25(3):282-7.
 100. Noakes TD, Norman RJ, Buck RH, Godlonton J, Stevenson K, Pittaway D. The incidence of hyponatremia during prolonged ultraendurance exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1990 Apr;22(2):165-70.
 101. Panush RS, Schmidt C, Caldwell JR, Edwards NL, Longley S, Yonker R, Webster E, Nauman J, Stork J, Pettersson H. Is running associated with degenerative joint disease? *JAMA*. 1986 Mar 7;255(9):1152-4.
 102. 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*. 1998;194(1):41-7.
 103. Pastoureau PC, Hunziker EB, Pelletier JP. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct;18 Suppl 3:S106-12
 104. Peters EM. Nutritional aspects in ultra-endurance exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Jul;6(4):427-34.
 105. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*. 1997 Jul;191 (Pt 1):1-13.

-
106. Poole R, Blake S, Buschmann M, Goldring S, Lavery S, Lockwood S, Matyas J, McDougall J, Pritzker K, Rudolphi K, van den Berg W, Yaksh T. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct;18 Suppl 3:S10-6.
 107. Priest N, Armstrong R, Doyle J, Waters E. Interventions implemented through sporting organisations for increasing participation in sport. *Cochrane Database Syst Rev*.
 108. Pritzker KPH. Pathology of osteoarthritis. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, Eds. *Osteoarthritis*. 2nd edn. Oxford University Press 2003;49-58.
 109. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jan;14(1):13-29.
 110. Quintavalla J, Kumar C, Daouti S, Slosberg E, Uziel-Fusi S. Chondrocyte cluster formation in agarose cultures as a functional assay to identify genes expressed in osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2005 Aug;204(2):560-6.
 111. Rees JA, Ali SY. Ultrastructural localisation of alkaline phosphatase activity in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1988 Sep;47(9):747-53.
 112. Rezende MU, Gurgel HM, Vilaça Junior PR, Kuroba RK, Lopes AS, Phillipi RZ, Hernandez AJ. Diacerhein versus glucosamine in a rat model of osteoarthritis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006 Oct;61(5):461-6.

-
113. Rieppo J, Hallikainen J, Jurvelin JS, Kiviranta I, Helminen HJ, Hyttinen MM. Practical considerations in the use of polarized light microscopy in the analysis of the collagen network in articular cartilage. *Microsc Res Tech*. 2008 Apr;71(4):279-87.
114. Robins A. Nutritional recommendations for competing in the Ironman triathlon. *Curr Sports Med Rep*. 2007 Jul;6(4):241-8.
115. Roddy E, Zhang W, Doherty M, Arden NK, Barlow J, Birrell F, Carr A, Chakravarty K, Dickson J, Hay E, Hosie G, Hurley M, Jordan KM, McCarthy C, McMurdo M, Mockett S, O'Reilly S, Peat G, Pendleton A, Richards S. Evidence-based recommendations for the role of exercise in the management of osteoarthritis of the hip or knee--the MOVE consensus. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Jan;44(1):67-73.
116. Roos, E.M. e L. Dahlberg. 2005. Positive effects of moderate exercise on glycosaminoglycan content in knee cartilage: a four-month, randomized, controlled trial in patients at risk of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 52: 3507–3514
117. Roughley PJ, White RJ. Age-related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. *J Biol Chem*. 1980 Jan 10;255(1):217-24.
118. Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Jan;18(1):12-23.
119. Säämänen AM, Kiviranta I, Jurvelin J, Helminen HJ, Tammi M. Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular

-
- cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. *Connect Tissue Res.* 1994;30(3):191-201.
120. Säämänen AM, Tammi M, Jurvelin J, Kiviranta I, Helminen HJ. Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in the articular cartilage of young canine knee (stifle) joint. *J Orthop Res.* 1990 Nov;8(6):863-73.
121. Schmitz N, Lavery S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Oct;18 Suppl 3:S113-6.
122. Schouten JS, de Bie RA, Swaen G. An update on the relationship between occupational factors and osteoarthritis of the hip and knee. *Curr Opin Rheumatol.* 2002 Mar;14(2):89-92.
123. Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, Taylor JR. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. *J Anat.* 1994 Feb;184 (Pt 1):73-82.
124. Schwartz ER, Greenwald RA. Experimental models of osteoarthritis. *Bull Rheum Dis.* 1979-1980;30(6):1030-3.
125. Seidel JO, Pei M, Gray ML, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Long-term culture of tissue engineered cartilage in a perfused chamber with mechanical stimulation. *Biorheology.* 2004;41(3-4):445-58.
126. Sekiya I, Tang T, Hayashi M, Morito T, Ju YJ, Mochizuki T, Muneta T. Periodic knee injections of BMP-7 delay cartilage degeneration induced by excessive running in rats. *J Orthop Res.* 2009 Aug;27(8):1088-92

-
127. Sharma G, Saxena RK, Mishra P. Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2007 Feb;22(2):248-55.
 128. Shelton JC, Bader DL, Lee DA. Mechanical conditioning influences the metabolic response of cell-seeded constructs. *Cells Tissues Organs*. 2003;175(3):140-50.
 129. Shoji H, D'Ambrosia RD, Dabezies EJ, Taddonio RF, Pendergrass J, Gristina AG. Articular cartilage and subchondral bone changes in an experimental osteoarthritic model. *Surg Forum*. 1978;29:554-6.
 130. Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Castaneda-Sceppa C, White RD. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006 Jun;29(6):1433-8.
 131. Silver FH, Bradica G. Mechanobiology of cartilage: how do internal and external stresses affect mechanochemical transduction and elastic energy storage? *Biomech Model Mechanobiol*. 2002 Dec;1(3):219-38.
 132. Silver FH, Bradica G, Tria A. Do changes in the mechanical properties of articular cartilage promote catabolic destruction of cartilage and osteoarthritis? *Matrix Biol*. 2004 Nov;23(7):467-76.
 133. Smale G, Bendele A, Horton WE Jr. Comparison of age-associated degeneration of articular cartilage in Wistar and Fischer 344 rats. *Lab Anim Sci*. 1995 Apr;45(2):191-4

-
134. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study *BMJ*. 1996;312:940-3.
135. Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, Wolman RL, Doyle DV. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum*. 1996 Jun;39(6):988-95.
136. Stephenson J, Bauman A, Armstrong T, Smith B, Bellew B. In: *The costs of illness attributable to physical inactivity in Australia: a preliminary study* Canberra: Commonwealth Department of Health and Aged Care and the Australian Sports Commission, 2000:-.
137. Sohn RS, Micheli LJ. The effect of running on the pathogenesis of osteoarthritis of the hips and knees. *Clin Orthop Relat Res*. 1985 Sep;(198):106-9.
138. Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Clark Billingham R, Robin Poole A, van den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*. 2000 Sep;43(9):2121-31.
139. Stoop R, van der Kraan PM, Buma P, Hollander AP, Poole AR, van den Berg WB. Denaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis. Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage. *J Pathol*. 1999 Jul;188(3):329-37.

-
140. Sun HB. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Nov;1211:37-50.
141. Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA.* 2002 Oct 23-30;288(16):1994-2000.
142. Tang T, Muneta T, Ju YJ, Nimura A, Miyazaki K, Masuda H, Mochizuki T, Sekiya I. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R13.
143. Tanimoto K, Kitamura R, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K. Modulation of hyaluronan catabolism in chondrocytes by mechanical stimuli. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Apr;93(1):373-80.
144. Teitz CC, Kilcoyne RF. Premature osteoarthrosis in professional dancers. *Clin J Sport Med.* 1998 Oct;8(4):255-9
145. THAXTER TH, MANN RA, ANDERSON CE.
DEGENERATION OF IMMOBILIZED KNEE JOINTS IN RATS; HISTOLOGICAL AND AUTORADIOGRAPHIC STUDY. *J Bone Joint Surg Am.* 1965 Apr;47:567-85
146. Tiderius CJ, Svensson J, Leander P, Ola T, Dahlberg L. dGEMRIC (delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage) indicates adaptive capacity of human knee cartilage. *Magn Reson Med.* 2004 Feb;51(2):286-90.
147. van Meurs JB, van Lent PL, Holthuysen AE, Singer II, Bayne EK, van den Berg WB. Kinetics of aggrecanase- and

- metalloproteinase-induced neopeptides in various stages of cartilage destruction in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Jun;42(6):1128-39.
148. Venn MF. Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. *Ann Rheum Dis.* 1979 Feb;38(1):57-62.
149. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, Stöss H. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* 1992 Jul;35(7):806-11.
150. Wancket LM, Baragi V, Bove S, Kilgore K, Korytko PJ, Guzman RE. Anatomical localization of cartilage degradation markers in a surgically induced rat osteoarthritis model. *Toxicol Pathol.* 2005;33(4):484-9.
151. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Dec;14(12):1237-47.
152. Williams JM, Felten DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat.* 1982 Jan;134(Pt1):103-9.
153. Yorimitsu M, Nishida K, Shimizu A, Doi H, Miyazawa S, Komiyama T, Nasu Y, Yoshida A, Watanabe S, Ozaki T. Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent

-
- destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Jul;16(7):764-71
154. Yoshimura N, Sasaki S, Iwasaki K, Danjoh S, Kinoshita H, Yasuda T, Tamaki T, Hashimoto T, Kellingray S, Croft P, Coggon D, Cooper C. Occupational lifting is associated with hip osteoarthritis: a Japanese case-control study. *J Rheumatol*. 2000 Feb;27(2):434-40.
155. Zambrano NZ, Montes GS, Shigihara KM, Sanchez EM, Junqueira LC. Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anat (Basel)*. 1982;113(1):26-38.
156. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Feb;16(2):137-62.

NORMAS ADOTADAS

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Princípios éticos da experimentação animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.cobea.org.br/>

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001. 248p.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira, LM. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses - Guia prático, São Paulo: Livraria Médica paulista Editora LTDA; 2008. 84p.

ABSTRACT

Introduction: Exercise is an increasingly widespread habit with proven health benefits. Mild and moderate exercise causes beneficial changes in cartilage and are advocated for the treatment of osteoarthritis, however, the relationship between excessive or strenuous exercise and osteoarthritis remains a matter of controversy. **Objective:** Investigate whether osteoarthritic changes could be obtained in a new protocol named ultra-endurance training of rats. **Methods:** Wistar rats were divided into two groups: control group (GC) with 12 animals and trained group (GT) with 12 animals. The GT animals undergone a training run on a treadmill with progressive improvement in fitness for 12 weeks doing a final running exercise to exhaustion. They ran at least 55 km in 12 weeks. After this period, both groups were sacrificed and their knees were removed for histomorphometrical, histomorphological, histochemical, electrophoretic and fluorimetric analyses. **Results:** There were significant differences between the two groups. The GT had a higher number of chondrocytes, a significant increase in the number of chondrocytes clusters, more chondrocyte cell death, higher grades of osteoarthritis histological classification and a marked decrease in sulphated glycosaminoglycans and hyaluronic acid concentrations. **Conclusions:** The articular cartilage of the trained rats submitted to ultra-endurance exercise showed predisposing osteoarthritic changes such as pathological cellular alterations like increased clusters of chondrocytes and increased chondrocytes with features of cell death in addition to the significant reduction of extracellular matrix components such as hyaluronic acid and sulfated glycosaminoglycans.

ANEXOS



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 4 de abril de 2008.
CEP 0302/08

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA FRANCOZI
Co-Investigadores: Victor Tarini, Rejane Danieli Reginato, Valquíria Pereira de Medeiros, Eduardo Katchburian, Helena Nader, Flávio Faloppa (orientador)
Disciplina/Departamento: Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos do exercício de ultraendurance sobre a cartilagem articular de ratos treinados".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria D - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Determinar os efeitos do exercício de ultraendurance sobre a cartilagem articular de ratos treinados com exercícios ultra prolongados de corrida..

RESUMO: Estudo com 60 ratos Wistar. Anestésico: pentobarbital. Eutanásia: decapitação. Animais selecionados serão divididos em dois grupos: grupo treinamento (GT) e grupo controle (GC). Os animais pertencentes ao grupo GT serão submetidos a um treinamento de corrida com duração inicial de 40 min na esteira a uma velocidade de 20 metros por minuto, cinco dias por semana durante 12 semanas. A cada semana serão acrescentados cinco minutos no tempo total. Ao final das 12 semanas de treinamento, os animais do grupo GT serão submetidos a um exercício de ultraendurance em esteira a uma intensidade que corresponderá a 60% do VO2 máximo até a exaustão. Ao final do exercício, todos os animais de ambos os grupos deverão ser sacrificados para retirada dos dois membros posteriores e separação dos dois fêmures, juntamente com aspiração do líquido sinovial de ambos os joelhos. Serão realizados cortes histológicos para avaliar o padrão e distribuição das células. Será realizada coloração de Azul de Alcian para avaliar substâncias mucossulfatadas. Será realizada extração e identificação dos glicosaminoglicanos sulfatados da cartilagem, condroitim sulfatos, dermatam sulfatos, heparam sulfatos e heparinas. A quantificação do ácido hialurônico será realizada através de um ensaio fluorimétrico não competitivo. Serão detectados os ácidos hialurônicos por técnica histoquímica em material emblocado em parafina..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A literatura descreve alterações da cartilagem articular no exercício ultra prolongado, mediante treinamento e condicionamento. No entanto, não foram observados ainda os efeitos do exercício de ultraendurance sobre a mesma. Este estudo visa avaliar os efeitos do exercício de ultraendurance na cartilagem articular em ratos..



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, utilizando metodologia de domínio do laboratório..
DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..
CRONOGRAMA: 18 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 30/3/2009 e 30/3/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
 Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

FONTES CONSULTADAS

Weiszflog, W. Michaelis Dicionário Escolar Língua Portuguesa, 7a ed. São Paulo: Melhoramentos, 2010. 951p.

Kirkwood, B. R. and Sterne, J. A. C. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts : Blackwell Science, 2006. 502p.