

MAIZE REZENDE GALVÃO

ASPECTOS CLÍNICOS E MORFOFISIOLÓGICOS DA ARTICULAÇÃO  
FÊMORO-TÍBIO-PATELAR DE RATOS APÓS IMOBILIZAÇÃO PROLONGADA  
E REMOBILIZAÇÃO.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

MAIZE REZENDE GALVÃO

ASPECTOS CLÍNICOS E MORFOFISIOLÓGICOS DA ARTICULAÇÃO  
FÊMORO-TÍBIO-PATELAR DE RATOS APÓS IMOBILIZAÇÃO PROLONGADA  
E REMOBILIZAÇÃO.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de abril de 2005.

---

Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria  
(conselheira)

---

Prof. Antônio José Natali  
(conselheiro)

---

Prof. Cláudio César Fonseca

---

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer

---

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo  
(orientador)

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, pelo amor, pelos ensinamentos de toda uma vida, pelo apoio, e por serem meus pais.

Aos meus irmãos, Eduardo e Simone pelo incentivo e exemplo de profissionais.

Ao Mateus, pelo carinho, dedicação e por me mostrar como é fácil ser feliz.

Com muito amor, dedico.

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao meu orientador, Professor Ricardo Junqueira Del Carlo, pelo apoio, confiança, oportunidade e incentivo durante todo o trabalho.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilorio, pela disponibilidade para avaliação dos resultados desta pesquisa, pelas valiosas sugestões e críticas.

Ao Professor Antônio José Natali, pelo auxílio e ensinamentos neste trabalho.

Ao Doutor José do Carmo pela dedicação, experiência e ajuda na avaliação dos resultados.

Às amigas Paloma e Ana Laetícia pela boa vontade e disposição na cooperação para a execução da parte prática deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, Adão e Juliano, pela boa vontade que tanto me ajudaram.

Aos funcionários Adão e Cláudio, do laboratório de histopatologia, pela paciência e ajuda tão necessária para a confecção das lâminas.

Ao professor Cláudio Fonseca, pela experiência e ajuda.

Ao professor Cosme Damião, pela inestimável ajuda nas análises estatísticas.

À Maninha, Rose e Lucinda, por serem sempre tão prestativas.

Aos demais professores do departamento de veterinária, pelo conhecimento transmitido.

Aos colegas de mestrado, pela ajuda sempre presente, companheirismo e amizade.

À Naka e Cristina Yumi, por fazerem parte da minha vida.

À minha amiga do coração Aida, por ser esta pessoa tão presente e pelos momentos felizes que passamos juntas.

À minha sobrinha Isabella e meu afilhado Bernardo, que são tão pequenininhos e capazes de despertar tanta alegria.

Ao meu grande companheiro Ziggy, que hoje não está mais ao meu lado mas ficará pra sempre dentro do meu coração.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABELAS .....	VI
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	IX
1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	1
2 – MATERIAL E MÉTODOS .....	5
2.1 – Animais de experimentação .....	5
2.2 – Modelo de imobilização .....	5
2.3 – Modelos de exercício .....	6
2.4 – Avaliação clínica .....	7
2.5 – Avaliação fisiológica .....	7
2.6 – Avaliação histológica .....	7
2.7 – Tratamento estatístico .....	8
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	9
4 – CONCLUSÕES .....	23
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	24

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Metodologia utilizada para a imobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar direita dos ratos.	6
Figura 2	Análise histológica da cápsula articular nos animais dos grupos 2, 3 e 4 submetidos à imobilização; imobilização e remobilização com atividade livre; imobilização e remobilização com atividade livre e natação.	12
Figura 3	Alteração da metacromasia nos animais dos grupos 2 e 3 submetidos à imobilização; imobilização e remobilização com atividade livre.	14
Figura 4	Alteração na população e disposição dos condrócitos na cartilagem articular de animais submetidos à imobilização; imobilização e remobilização com atividade livre.	16
Figura 5	Avanço da linha de maré com aumento da espessura da cartilagem calcificada nos animais dos grupos 2, 3 e 4 submetidos à imobilização; imobilização e remobilização com atividade livre e; imobilização e remobilização com atividade livre e natação.	17
Figura 6	Presença da formação de tecido conjuntivo fibroso em animais dos grupos 2, 3 e 4 submetidos à imobilização; imobilização e remobilização com atividade livre e; imobilização e remobilização com atividade livre e natação.	18
Figura 7	Presença de vaso sanguíneo na cartilagem articular nos animais do grupo 2 submetidos à imobilização.	18
Figura 8	Presença de tecido de granulação adjacente ao espaço medular subcondral nos animais dos grupos 3 e 4 submetidos à imobilização e remobilização com atividade livre e; imobilização e remobilização com atividade livre e natação.	19
Figura 9	Alteração da espessura do osso subcondral em animal do grupo 3 submetido à imobilização e remobilização com atividade livre.	20
Figura 10	Alteração da superfície articular em animal do grupo 3 submetido à imobilização e remobilização com atividade livre.	21

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Demonstrativo do teste de análise de variância da marcha dos grupos 3 e 4, após 45 dias de imobilização e 5 semanas de remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar.	9
Tabela 2 Comparação do desempenho médio das marchas ao longo do período de remobilização, pelo teste de Tukey, em relação às notas aplicadas a evolução da marcha.	10

## RESUMO

GALVAO, Maize Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005. **Aspectos clínicos e morfofisiológicos da articulação fêmoro-tibio-patelar de ratos após imobilização prolongada e remobilização.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Conselheiros: Antônio José Natali e Marlene Isabel Vargas Vilorio.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os aspectos clínicos e morfofisiológicos da articulação do joelho de ratos após imobilização prolongada e remobilização com atividade livre e natação. Trinta e quatro ratos adultos machos (Wistar) foram alocados aleatoriamente em um dos quatro grupos: sem imobilização (G1,  $n = 4$ ), com imobilização (G2,  $n = 10$ ), imobilização e remobilização com atividade livre (G3,  $n = 10$ ), imobilização e remobilização com atividade livre e natação (G4,  $n = 10$ ). Os animais tiveram o joelho direito imobilizado por 45 dias. Os animais do G2 foram sacrificados após o período de imobilização, juntamente com os animais do G1. Após o período de imobilização os animais do G3 movimentaram livremente em suas respectivas gaiolas e os animais do G4, além da movimentação na gaiola, foram submetidos a um programa de natação por 5 semanas, sendo todos sacrificados em seguida. Durante este período de remobilização os animais dos G3 e G4 foram submetidos a avaliação clínica da marcha. Após sacrifício a resistência à flexão articular do joelho direito de todos os animais foi avaliada e

cortes histológicos da cápsula articular, cartilagem e osso subcondral foram obtidos. Os resultados mostraram que os animais do G4 apresentaram melhor evolução na marcha nos cinco primeiros dias, em relação àqueles do G3. Após este período a evolução na marcha foi similar nos G3 e G4. Animais do G2 apresentaram rigidez articular enquanto nos do G3 e G4 o movimento estava próximo ao normal. A análise histológica mostrou que a imobilização promoveu aumento da espessura da cápsula articular, evidenciada pela presença do tecido conjuntivo fibroso substituindo o tecido adiposo no G2, mas em menor proporção nos G3 e G4. Pela análise da cartilagem articular e osso subcondral pode-se observar que a imobilização determinou perda de proteoglicanos da matriz cartilaginosa, aumento do número de condrócitos dispostos de forma irregular, aumento da espessura da cartilagem calcificada, irregularidade da superfície articular, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e aumento da espessura do osso subcondral. Os animais do G3 apresentaram um maior número de alterações tanto na cartilagem articular como no osso subcondral, quando comparados com aqueles do G4. Concluiu-se que a imobilização degenerou as células sinoviais, indicando diminuição da produção de fluido sinovial e redução do suprimento nutricional à cartilagem; e que tanto a atividade livre na gaiola quanto sua associação com a natação influenciaram positivamente o retorno das condições morfológicas da cápsula, anteriores à imobilização.

## ABSTRACT

GALVAO, Maize Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2005.  
**Clinical and morphophysiological aspects of the rat knee articulation after immobilization and remobilization.** Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo. Committee Members: Antônio José Natali and Marlene Isabel Vargas Vitoria.

The aim of this study was to evaluate the clinical and morphophysiological aspects of the rat knee articulation after immobilization and remobilization with free activity and swimming. Thirty four adult male rats (Wistar) were randomly allocated into one of four groups: without immobilization, (G1,  $n = 4$ ), with immobilization (G2,  $n = 10$ ), immobilization and remobilization with free activity (G3,  $n = 10$ ), and immobilization and remobilization with free activity and swimming (G4,  $n = 10$ ). Animals had the right knee joint immobilized for 45 days. Animals from G2 were killed after this immobilization period and so were those from G1. After the immobilization period animals from G3 were allowed to move freely in their cages and those from G4 add to that were submitted to a swimming program for 5 weeks and were than all killed. During the remobilization period animals from G3 and G4 had their march clinically evaluated. After being killed the articular amplitude of the right knee was assessed in all animals and histological slices from the articular capsule,

cartilage and subchondral bone were obtained. The results showed that animals from G4 exhibited a better march evolution on the first five days period as compared to those from G3. After such period march evolution were similar in both G3 and G4. Animals from G2 displayed rigid joint while in those from G3 and G4 the articular movement was close to normal. The histological analysis pointed out that immobilization led to increase in articular capsule thickness evidenced by the presence of fibrous connective tissue replacing adipose tissue in G2, but proportionally less in G3 and G4. By the analysis of the articular cartilage and subchondral bone it was observed that immobilization determined loss of proteoglycans from the cartilaginous matrix, increase in the number of regularly arranged chondrocytes, increase in calcified cartilage thickness, irregularity in the articular surface, proliferation of connective tissue in the intra-articular space and increase in subchondral bone thickness. A animals from G3 displayed a greater number of alterations in both articular cartilage and subchondral bone, as compared to those from G4. It was concluded that: immobilization degenerated synovial cells indicating decreased synovial fluid production and reduced nutritional supplying to the cartilage; and both free cage activity and its association with swimming influenced positively the return of the capsule morphologic conditions to those before immobilization.

## 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As mudanças histológicas que ocorrem após imobilização de articulação sinovial normal são progressivas e incluem proliferação dos tecidos sinovial e conjuntivo, aderência da superfície articular, necrose e ulceração da cartilagem, e alterações do osso subcondral (THAXTER et al., 1965).

Quando a articulação do joelho é imobilizada por um período prolongado, as mudanças degenerativas na cartilagem podem ser ocasionadas por pressão local ou ausência dela e se assemelham às produzidas nas doenças articulares degenerativas (TROYER, 1975).

A carga mecânica influencia o desenvolvimento e a manutenção do tecido esquelético, incluindo a cartilagem articular. Especificamente, a pressão hidrostática intermitente é responsável pela manutenção da cartilagem. Já a pressão, fricção e a carga estática prolongada ou ausência dela determinam destruição e ossificação da cartilagem (VANWANSEELE et al., 2002).

Estudos realizados em humanos, mostraram que, após imobilização, tanto a cartilagem articular, quanto o osso subcondral e os músculos periarticulares sofrem rápida e freqüentemente, profunda atrofia de desuso (BRANDT, 2003).

A cartilagem articular requer algum regime de carga e movimento para manter sua natureza física e propriedades bioquímicas. Modelos experimentais, *in vivo*, de redução de carga articular e imobilização do membro

induzem a degeneração articular, incluindo redução da hidratação, alteração da estrutura e redução da síntese de proteoglicanos. A diminuição da espessura da cartilagem articular, observada em alguns locais, pode refletir na diminuição da capacidade de absorção de cargas na articulação. Algumas destas alterações são, ao menos parcialmente, reversíveis para valores normais após a remobilização da articulação (LEROUX et al., 2001; NARMONEVA et al., 2002).

De acordo com HAAPALA et al. (1999), as mudanças induzidas pela falta de carga na articulação de cães, são reversíveis em muitos locais estudados na matriz da cartilagem calcificada e na matriz da cartilagem não calcificada, mas a completa restauração da concentração de glicosaminoglicanos de forma uniforme, mesmo após a remobilização por 50 semanas, sugere que um longo período de remobilização pode ser necessário.

Segundo FINSTERBUSH & FREDMAN (1973) e ROY (1970), mudanças degenerativas na cartilagem que iniciaram-se na camada superficial, estenderam-se às camadas profundas com o prolongamento do tempo de imobilização.

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

A imobilização prolongada em cães alterou os proteoglicanos exercendo forte influencia negativa na propriedade biomecânica da cartilagem (HAAPALA et al., 1999). Estudos realizados por FU et al. (2001), mostraram que seis semanas de imobilização produziram doença articular degenerativa em joelhos de coelhos, onde o conteúdo de água aumentou e o de proteoglicanos diminuiu significativamente.

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

Segundo JAMES & UHLT (2001), a exposição da cartilagem articular humana a traumatismos pode suprimir a síntese de proteoglicanos. Estes traumas podem afetar, também, a matriz e os condrócitos, mas a perda de proteoglicanos é a mudança inicial mais óbvia. A cessação do processo responsável pela perda dos proteoglicanos permite aos condrócitos restaurar os componentes da matriz, e à cartilagem articular retornar a sua composição e funções normais. Entretanto, se este processo continua, os danos ocorridos na cartilagem podem se tornar irreversíveis.

Após imobilização da articulação de ratos, a degeneração e necrose dos condrócitos ocorrem tanto nas áreas de contato quanto naquelas livres de contato. As mudanças nas áreas de contato aparecem precocemente e são mais severas, resultando em rápido início de necrose. As alterações ocorrem tanto por ação da compressão mecânica quanto pela imobilização, por impedir a difusão de nutrientes do fluido sinovial pela cartilagem comprimida. A imobilização pode também impedir a difusão do fluido sinovial pela ausência de movimento articular e conseqüente falta de bombeamento. Assim, as mudanças nas áreas de contato representam a combinação dos efeitos compressão e imobilização (ROY, 1970).

FINSTERBUSH & FREDMAN (1973) observaram, após duas semanas de imobilização em coelhos, que a área da superfície articular, não submetida a contatos, foi coberta por fina camada de células sanguíneas e por material amorfo não identificado. Após quatro semanas de imobilização, no limite entre as áreas da cartilagem articular submetidas a contato e aquelas não submetidas a contato, a cartilagem encontrava-se espessada e com fissuras. O osso subcondral nesta região estava relativamente mais espesso em comparação com outras áreas.

O entendimento da relação entre uso/desuso articular e degeneração articular é importante no desenvolvimento de estratégias para prevenir e tratar doenças articulares como a osteoartrite ou estabelecer programas de reabilitação após procedimentos cirúrgicos ou restrição prolongada de movimentação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar clínica e morfofisiologicamente os efeitos da imobilização articular e da remobilização sobre o joelho de ratos,

pois o conhecimento destas alterações é essencial para a otimização de programas de reabilitação de pacientes humano e veterinário.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais de experimentação

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

### 2.2. Modelo de Imobilização

Os animais dos grupos 2, 3 e 4 foram anestesiados por inalação de éter etílico em câmara de gás e manutenção em circuito anestésico aberto e tiveram a articulação fêmoro-tíbio-patelar direita imobilizada com atadura gessada, conforme modelo proposto por FRATESCHI (2002), em posição de

extensão por 45 dias. O gesso foi colocado mantendo também a articulação coxofemoral em extensão e abdução de 45°. Para manter fixa a imobilização, o gesso foi colocado ao redor das regiões pélvica e abdominal, sendo que a articulação tíbio-társica foi mantida livre (Figura 1). O aparelho gessado foi substituído imediatamente, quando necessário, e não impedia o deslocamento dos animais nas gaiolas.



Figura 1 - Imobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar direita dos ratos.

### **2.3. Modelos de Exercício**

Os animais do G3, após a retirada do gesso, foram alojados em gaiolas apropriadas, movimentando-se livremente durante cinco semanas. Os animais do G4, após a retirada do gesso, da mesma forma, foram alojados em gaiolas, permitindo movimentação livre e, adicionalmente, foram submetidos a um programa progressivo de natação, cinco vezes por semana, durante cinco semanas de acordo com o seguinte protocolo: na primeira semana, para adaptação, os animais nadaram por cinco minutos, acrescentando-se cinco minutos a partir do segundo dia. Assim, ao final da primeira semana os animais estavam nadando 25 minutos. Na segunda semana, iniciou-se com 30 minutos de natação chegando aos 50 minutos. Na terceira semana, iniciou-se com 55 minutos de natação e segundo dia atingindo 60 minutos, a partir daí a sessão de natação teve duração diária de 60 minutos até a quinta semana.

A natação foi executada em um tanque com as seguintes dimensões: 80cm X 65cm X 45cm (profundidade, largura e comprimento, respectivamente),

com água aquecida e mantida entre 32 e 35°C para amenizar o estresse dos animais. O nível da água inicialmente foi de 19 cm para que os animais pudessem colocar o membro posterior esquerdo no fundo do tanque, permitindo uma adaptação do animal ao meio. A partir do segundo dia foi aumentado para 30cm, permitindo somente a natação livre.

#### **2.4. Avaliação Clínica**

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

#### **2.5. Avaliação fisiológica**

Os animais do G1 e G2 foram sacrificados por superdosagem anestésica (éter etílico) em câmara de gás logo após a retirada do gesso, enquanto que os animais do G3 e G4 foram sacrificados ao final do período de exercício, ou seja, após 5 semanas.

Para a avaliação da efetividade da remobilização, após o sacrifício dos animais do G1, G2, G3 e G4, analisou-se o grau de movimentação da articulação do joelho em comparação com a movimentação da articulação contra-lateral, determinando, desta forma, a resistência à flexão articular, de acordo com EVANS et al (1960).

#### **2.6. Avaliação histológica**

Para análise histológica, foram coletadas a cápsula articular da articulação fêmoro-tíbio-patelar e as epífises distal do fêmur e proximal da tíbia direita de todos os animais.

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

Os fragmentos osteocondrais coletados foram fixados em formol neutro a 10% tamponado, por aproximadamente 48 horas. Após a fixação, os fragmentos foram descalcificados em ácido fórmico a 10%, tamponado com citrato de sódio pH 4,5, sob vácuo moderado. Após descalcificação, estes fragmentos foram seccionados longitudinalmente e, então, processados rotineiramente pela técnica de inclusão em parafina. Os cortes de 6  $\mu$ m de espessura foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE) e Azul de toluidina e examinados ao microscópio óptico objetivando analisar alterações celulares e da matriz cartilaginosa, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e irregularidade da superfície articular e, no osso subcondral avaliar a espessura e aspecto das trabéculas.

## **2.7. Tratamento estatístico**

Para análise estatística, os dados da avaliação das marchas dos grupos atividade livre (G3) e atividade livre + natação (G4) foram submetidos aos testes de análise de variância (ANOVA) e teste F. Os dados foram em seguida submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade com resíduo combinado (Erro A + Erro B) e grau de liberdade combinado, para analisar o comportamento das médias das marchas ao longo do tempo. Os achados macroscópicos e histológicos foram submetidos à análise descritiva.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da avaliação da marcha dos grupos atividade livre (G3) e atividade livre + natação (G4), como dois tratamentos distintos, submetidos aos testes estatísticos estão representados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela1 – Demonstrativo da análise de variância da marcha dos grupos 3 e 4, após 45 dias de imobilização e 5 semanas de remobilização da articulação do joelho.

Fator de Variância	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	1	0,20	0,20	0,019	ns
Erro A	18	184,76	10,24		
Tempo	24	452,30	18,84	49,270	s
Interação	24	14,30	0,59	1,557	s
Erro B	432	165,24	0,3825		
TOTAL	499	816,8			
Média				4,08	
Coeficiente de variação parcela				78,5249	
Coeficiente de variação sub-parcela				15,1585	

De acordo com a tabela 1, não houve diferença significativa entre os tratamentos, a 5% de probabilidade pelo teste F, porém, o fator Tempo e a interação Tratamento “vs” Tempo foram significativos ao mesmo nível de significância.

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

<b>Observações</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
1	1,3 B	1,9 A
2	1,7 B	2,4 A
3	2,2 A	2,4 A
4	2,1 B	3,1 A
5	3,1 A	3,1 A
6	3,9 A	4,0 A
7	4,2 A	4,0 A
8	4,3 A	4,0 A
9	4,3 A	4,2 A
10	4,3 A	3,8 A
11	4,4 A	4,1 A
12	4,5 A	4,1 A
13	4,5 A	4,3 A
14	4,4 A	4,3 A
15	4,4 A	4,7 A
16	4,4 A	4,7 A
17	4,7 A	4,6 A
18	4,7 A	4,6 A
19	4,7 A	4,6 A
20	4,7 A	4,6 A
21	4,7 A	5,0 A
22	5,0 A	5,0 A
23	5,0 A	5,0 A
24	5,0 A	5,0 A
25	5,0 A	5,0 A

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

A avaliação da marcha do G4 demonstra uma significativa melhora nos cinco primeiros dias em relação ao G3 (Tabela 2). Após este período há tendência dos grupos apresentarem a mesma evolução em relação ao tempo. A melhora nos cinco primeiros dias da marcha do G4 pode estar relacionada aos efeitos fisiológicos do calor, pelo processo de condução passando da água aquecida para os tecidos, determinando alívio da dor ou aumento do seu limiar, relaxamento muscular, aumento do fluxo sanguíneo e a redução da rigidez articular providos pelo aumento da extensibilidade do colágeno (COLLINS, 1998). Pode também estar relacionada às atividades realizadas dentro da água que motivaram aumento da amplitude articular, fortalecimento dos músculos

enfraquecidos e aumento de sua tolerância ao exercício bem como redução de edemas pela ação da pressão hidrostática (CAMPION, 2000).

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

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

Na avaliação histológica da cápsula articular, observou-se no G2, espessamento da cápsula com substituição total do tecido adiposo por tecido conjuntivo fibroso (Figura 2b). No G3, em um animal houve substituição total, porém os outros animais se comportaram como o G4, em que houve espessamento, mas com a substituição parcial do tecido adiposo por tecido conjuntivo fibroso (Figura 2c). Infere-se que tanto o exercício livre (G3) quanto o orientado (G4) influenciaram positivamente o retorno das condições morfológicas da cápsula, anteriores a imobilização.

Em todos os animais do G2, ocorreu substituição do tecido adiposo por tecido fibroso e aumento da vascularização. Observou-se aumento da espessura da membrana sinovial e aumento do volume nuclear dos sinoviócitos. Nos animais dos grupos 3 e 4 houve aumento da espessura da membrana sinovial e presença de vilos (Figura 2d). Os sinoviócitos dos animais do G4, encontravam-se vacuolizados (Figura 2e).

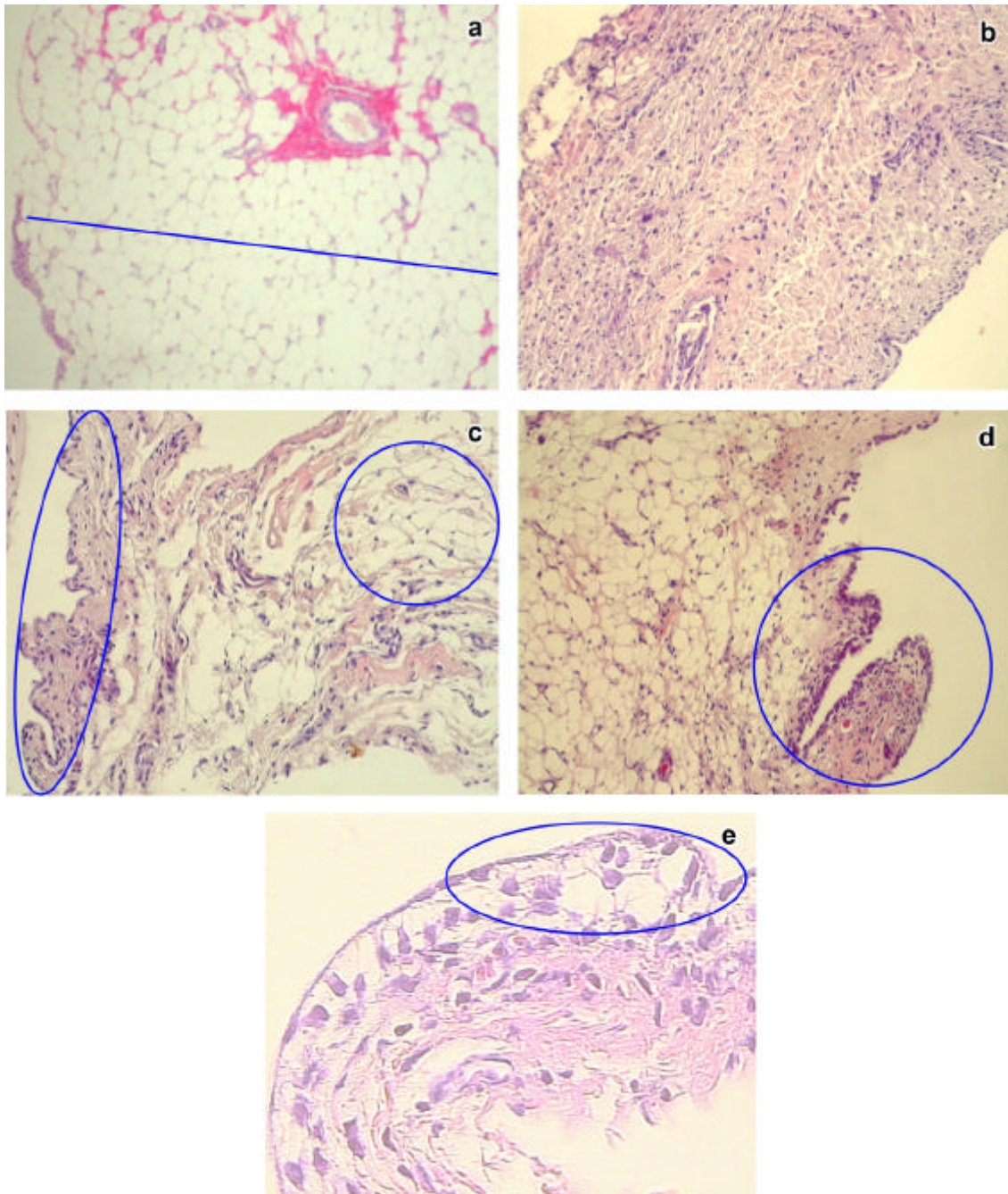


Figura 2 – Representação de imagens histológicas da cápsula articular. a: animal do G1, cápsula normal com grande quantidade de tecido adiposo (traço azul); b: animal do G2, substituição do tecido adiposo por tecido conjuntivo fibroso; c: animal do G3, substituição parcial do tecido adiposo (círculo) por tecido conjuntivo fibroso (elipse); d: animal do G3, espessamento da membrana sinovial e presença de vilos (círculo). HE, 200x; e: animal do G4, vacuolização dos sinoviócitos (elipse). HE, 400X.

Estes achados estão de acordo com ROY (1970) e FINSTERBUSH & FRIEDMAN (1973), sempre associando hiperplasia sinovial, formação de vilos

e proliferação celular na camada mais superficial em articulações imobilizadas. Os variados graus de degeneração observadas nas células sinoviais, resultaram em diminuição da produção de fluido sinovial e redução do suprimento nutricional à cartilagem. Conseqüentemente, a degeneração da cartilagem articular, vista ao longo das análises, deveu-se a atrofia da membrana sinovial determinando menor produção de líquido sinovial e a ausência de bombeamento, ocasionado pela imobilização, que inibiu a difusão da menor quantidade de líquido sinovial que estava sendo produzida, concordando com ROY (1970).

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

Com relação à cartilagem articular nos animais do grupo 2, a avaliação das lâminas coradas por azul de toluidina, demonstrou perda de metacromasia (Figura 3b), a partir do osso subcondral indicando perda dos componentes sulfatados da matriz da cartilagem. Entretanto, nos grupos 3 e 4, houve perda abrupta de metacromasia em áreas onde a cartilagem estava lesada (Figura 3c). Estes resultados estão de acordo com FINSTERBUSH & FRIEDMAN (1973) e TROYER (1975), já que em articulações imobilizadas, as mudanças metabólicas com perda da coloração metacromática da matriz cartilaginosa são prévias a qualquer mudança morfológica evidentes à microscopia óptica.

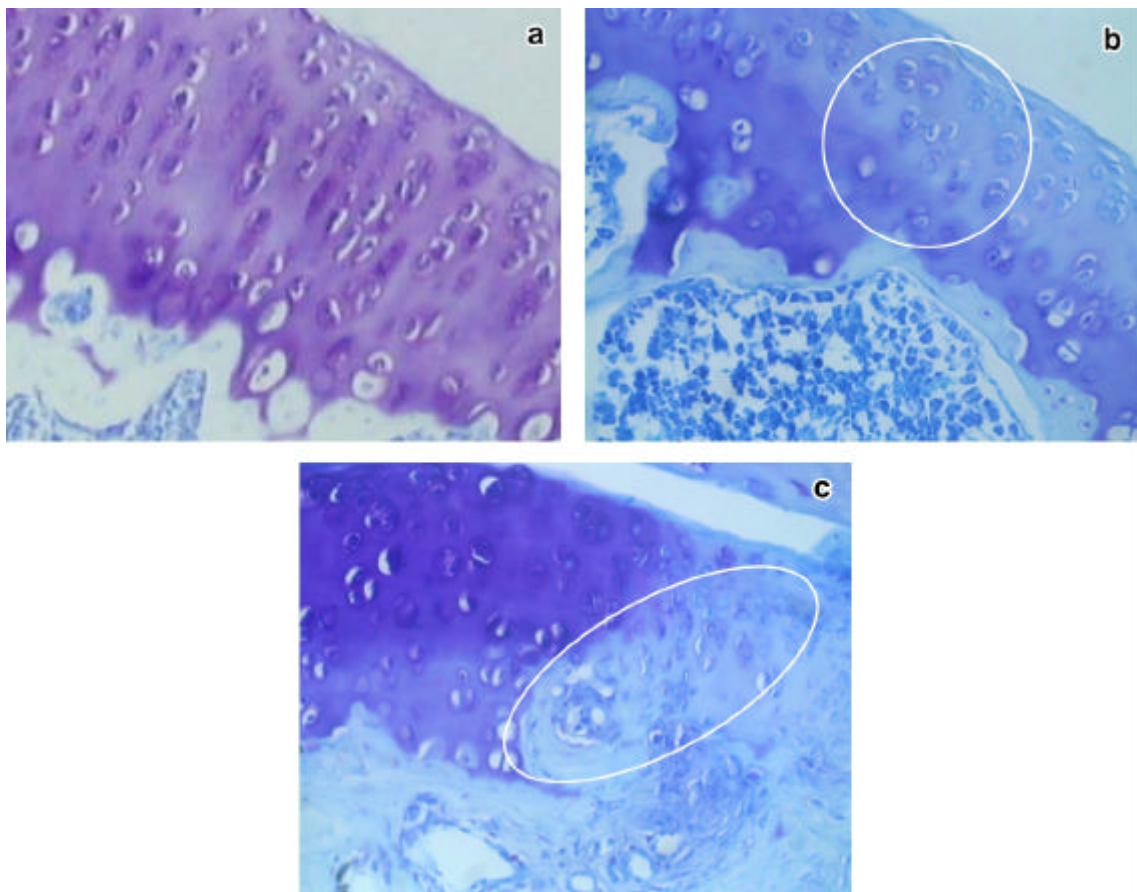


Figura 3 – Digitalização de imagem histológica representando a metacromasia na matriz articular. a: metacromasia da matriz cartilaginosa em animal do G1. b: perda de metacromasia na matriz da cartilagem articular, a partir do osso subcondral em direção a superfície cartilaginosa (círculo), em animal do G2. c: perda abrupta de metacromasia da matriz da cartilagem articular em área com lesão (elipse), em animal do G3. Azul de Toluidina, 400X.

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

Deve-se enfatizar que as melhoras advindas da atividade física devem ser relativizadas à intensidade do exercício. PALMOSKI & BRANDT (1984) estabeleceram um regime forçado de corrida, em cães (processo de reabilitação acelerado) e observaram que os proteoglicanos recém sintetizados não se depositaram, efetivamente, dentro da matriz e que os defeitos na

cartilagem permaneceram indefinidamente. Constataram também que, embora tivesse ocorrido aumento na síntese de proteoglicanos imediatamente após a remobilização, grande quantidade foi recuperada no líquido sinovial.

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

Pode-se observar ainda, no G2, aumento da população de condrócitos nas zonas superficial e intermediária, dispostos de forma irregular (Figura 4a) e não em colunas como na cartilagem normal (Figura 4b), semelhantemente ao descrito por HALL (1963), pois em áreas de contato de articulações imobilizadas, as células apresentam-se maiores que o normal e mais aglomeradas.

Esta formação de grupos isógenos (Figura 4c), segundo PIERMATTEI & FLO (1999) indica processo de divisão celular em resposta ao estresse anormal, constituindo-se em mecanismo natural de defesa da cartilagem.

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

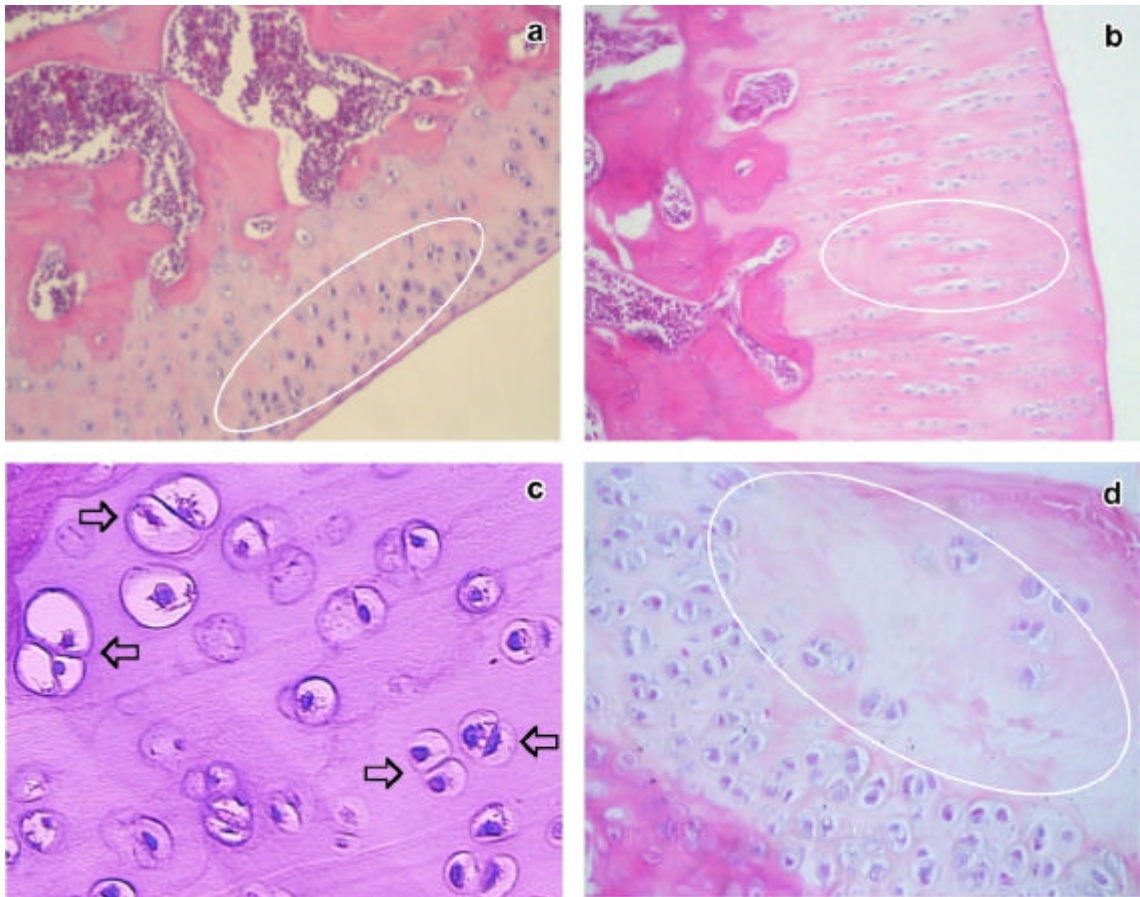


Figura 4 - Digitalização de imagem histológica representando aspectos celulares na cartilagem articular. a: animal do G2, aumento da população de condrócitos nas zonas superficial e intermediária (elipse), dispostos de forma irregular (HE, 200X). b: condrócitos disposto em colunas (elipse), G1 (HE, 200X). c: grupos isógenos (setas) em animal do G2 (HE, 1000X). d: animal do G3, diminuição da população de condrócitos em áreas de necrose (elipse) na cartilagem articular (HE, 400X).

Ainda, com relação à cartilagem articular em sete animais do grupo 2, nove do grupo 3 e seis do grupo 4, observou-se a presença do avanço da linha de maré (Figura 5), com aumento da espessura da cartilagem calcificada. Acredita-se que este processo seja uma adaptação à alteração da biomecânica da articulação e a natureza e distribuição de forças que são aplicadas na região superficial da cartilagem articular, adjacente ao espessamento (BURR, 2004). Contrariando os achados de O'Connor, citado por VANWANSEELE et al. (2002), os animais do grupo imobilizado não apresentaram aumento da espessura da cartilagem calcificada. Provavelmente, porque os animais do experimento estiveram imobilizados por 28 dias. Estes resultados foram semelhantes aqueles de LEROUX et al. (2001), que imobilizou cães durante 4 semanas e não constatou alteração da espessura da

cartilagem calcificada. Provavelmente, porque a observação no estudo de LEROUX et al. (2001) tenha ocorrido apenas na região de ausência de contato na tíbia.

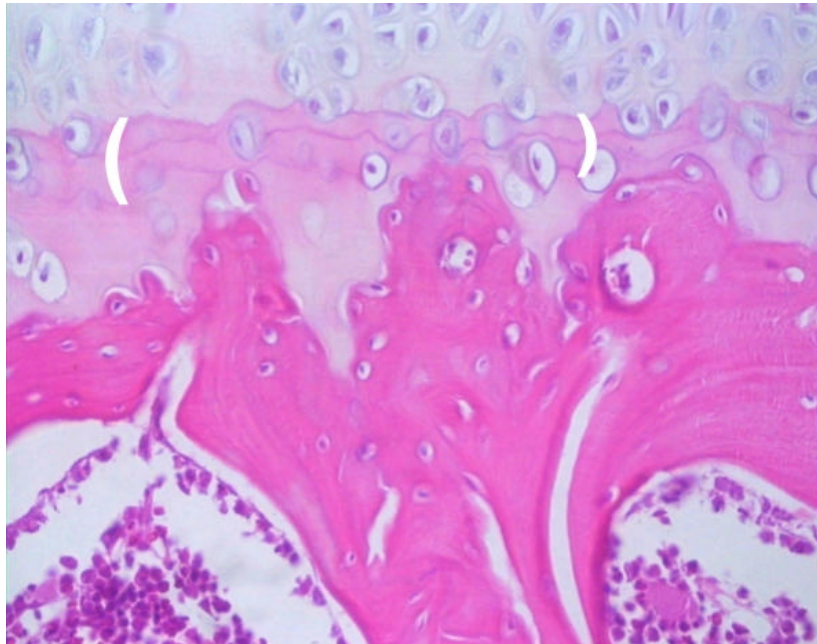


Figura 5 - Digitalização de imagem histológica demonstrando o avanço da linha de maré, entre parênteses, na cartilagem articular. HE, 400X.

Em um animal do G2, oito animais do G3 e três animais do G4, foi encontrado formação de tecido conjuntivo fibroso sobre à superfície articular (Figura 6a) em áreas de ausência de contato e próximo ao menisco, que pode ser uma resposta primária à limitação de movimento e advém da cápsula articular.

Portanto, com a limitação prolongada do movimento, as superfícies articulares que não mantinham contato com a superfície oposta foram cobertas pelo tecido conjuntivo que proliferou. Já nos pontos de contato entre o tecido conjuntivo e a cartilagem, formaram-se aderências transitórias e outras permanentes, que levaram a mudanças das células cartilaginosas (EVANS et al., 1960). Acredita-se que, o aparecimento do tecido conjuntivo e a conseqüente diminuição da espessura da cartilagem podem ter sido causados pela perda de adequada nutrição superficial e pela ausência do movimento. Em algumas regiões a cartilagem estava calcificada, não sendo mais observada a matriz e os condrócitos (6b).

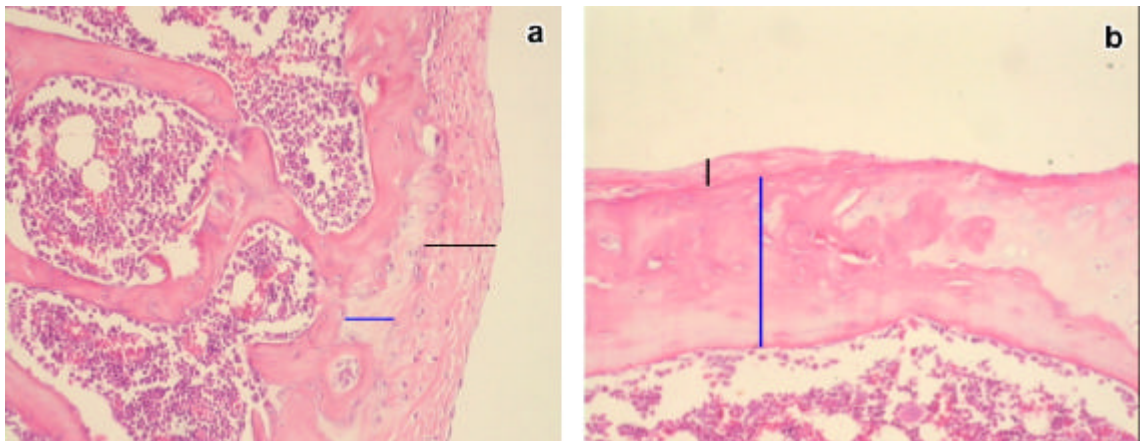


Figura 6 - Digitalização de imagem histológica representando a formação de tecido conjuntivo fibroso. a: formação de tecido conjuntivo fibroso (traço preto) no espaço intra-articular e sobre a superfície articular (traço azul) em áreas de ausência de contato entre superfícies articulares. b: tecido conjuntivo fibroso (traço preto) no espaço intra-articular e sobre a cartilagem calcificada (traço azul) em região de ausência da matriz cartilaginosa. HE, 200X.

Observou-se em três animais do G2, células com núcleo picnótico, provavelmente numa fase da apoptose ou necrose celular. Em seis animais foi observada penetração vascular na periferia da cartilagem (Figura 7), achado também relatado por HALL (1963). Estes vasos sanguíneos adentravam a cartilagem a partir do osso subcondral, talvez numa tentativa do organismo levar células e nutrientes a região lesada.

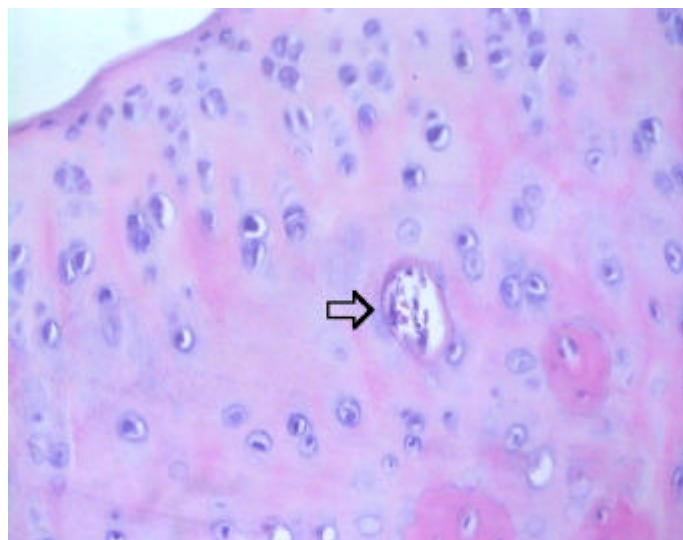


Figura 7 – Digitalização de imagem histológica demonstrando um vaso sanguíneo (seta) penetrando a cartilagem articular (HE, 400X).

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

O aparecimento de tecido conjuntivo muito vascular ou tecido de granulação no espaço medular subcondral (Figura 8) pode ser explicado de duas maneiras: como uma reação de cura em resposta ao dano limitado na cartilagem, numa tentativa dos vasos medulares suprirem elementos de nutrição e reparo; ou como uma reação de cura a lesão no osso subcondral causada por esforços transmitidos através da cartilagem, que presumivelmente fatigam e fraturam a placa subcondral. Segundo EVANS et al. (1960), desde que a erosão da cartilagem tenha ocorrido abaixo ou através da placa subcondral, ou se houver uma fenda conectando o osso subcondral e a cartilagem, o desenvolvimento de lesão subcondral pode ser esperado.

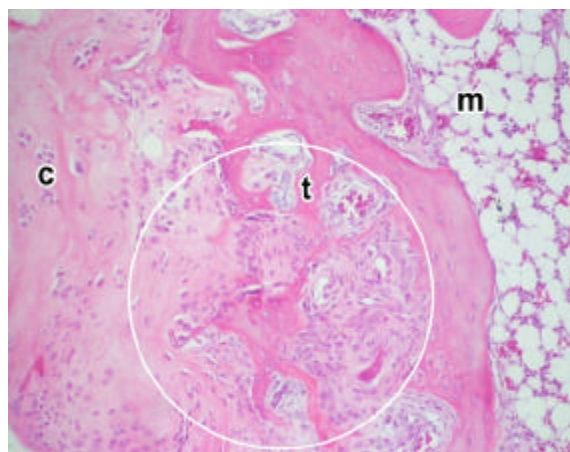


Figura 8 – Digitalização de imagem histológica demonstrando o tecido de granulação (círculo) adjacente ao espaço medular subcondral, onde m: medula óssea, t: trabécula e c: cartilagem (HE, 200X).

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

Em nove animais dos grupos 3 e 4, foi observado áreas com aumento da espessura do osso subcondral (Figura 9), em decorrência da alteração da mecânica articular desencadeada pela perda da capacidade da cartilagem adjacente de absorver estresse mecânico. O osso subcondral ficou sujeito a maior carga e como resposta houve aumento de sua espessura. O osso tornou-se mais espesso, perdeu característica trabecular, deformando menos diante das forças que são depositadas sobre a articulação. Com isso, forças maiores e nos dois sentidos foram exercidas sobre a cartilagem, que já estava anormal, resultando em danos ainda maiores sobre os condrócitos e a matriz cartilaginosa.

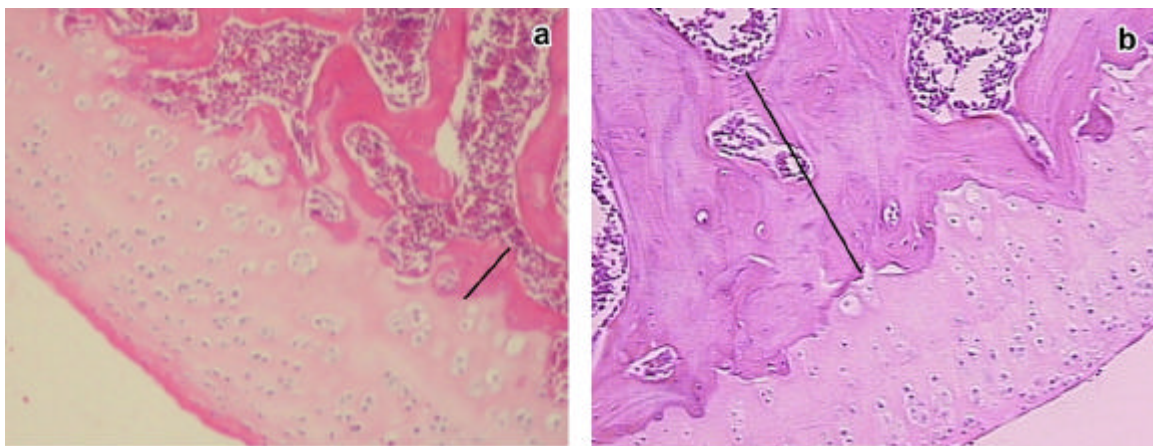


Figura 9 – Digitalização de imagem histológica representando a superfície articular. a: espessura do osso subcondral (traço preto) em animal do G1. b: aumento da espessura do osso subcondral (traço preto) em relação ao controle, em animal do G3 (HE, 100X).

Nove animais dos grupos 3 e cinco animais do grupo 4 apresentaram achatamento da superfície articular do fêmur e da tíbia (Figura 10). Este achado pode ser explicado pela integridade da cartilagem articular ser

dependente das propriedades mecânicas do seu leito subcondral. O espessamento do osso subcondral pode também afetar a conformação articular, criando áreas de contato máximo embaixo da carga a que está sujeito. Segundo RANDIN & ROSE (1986), a cartilagem articular é viscoelástica e o osso tem um comportamento elástico sob cargas fisiológicas, então, é lógica a hipótese de que forças impulsivas (súbitas) são mais destrutivas ao osso e a cartilagem do que as forças que são aplicadas gradualmente de igual valor. Microdanos cumulativos repetitivos levam a remodelamento, espessamento ósseo e lesão da cartilagem (THAXTER et al., 1965).

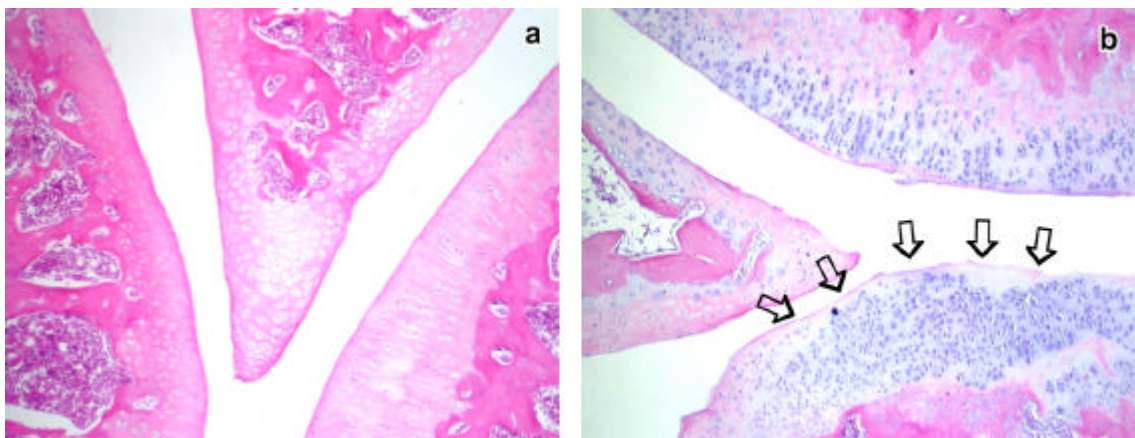


Figura 10 – Digitalização de imagem histológica representando a superfície articular. a: regularidade da superfície articular normal em animal do G1. b: superfície articular irregular (setas) em animal do G3. HE, 40X.

Após 45 dias de imobilização, observou-se nos animais dos grupos 2, 3 e 4 rigidez articular e hipotrofia da musculatura. Durante a coleta da cápsula, nesta época, ela se encontrava espessa e aderida à articulação, reduzindo o espaço articular. Provavelmente, a realização de movimentação excessiva desta articulação, determina aumento das forças de compressão e dos movimentos de fricção, acarretando lesão da cartilagem articular.

Ainda deve-se considerar que, após remoção da imobilização, os animais do G3 iniciaram a deambulação sem qualquer preparação da articulação, que se encontrava pouco lubrificada, com nutrição deficiente, com alteração da mecânica articular pela perda dos componentes da matriz (LEROUX et al., 2001; NARMONEVA et al., 2002), espessamento e fibrose da cápsula articular e atrofia muscular. O resultado foi sobrecarga articular, alterações celulares da cartilagem, lesões severas com áreas de necrose,

irregularidade das superfícies articulares e no osso subcondral aumento da espessura e reabsorção trabecular.

Os animais do G4, que foram submetidos à natação, apesar de apresentarem algumas destas lesões, próprias do processo degenerativo imposto pela imobilização, apresentaram quadro menos severo. A natação determinou alívio do estresse sobre as articulações, permitindo a realização de movimentos em forças gravitacionais reduzidas (CAMPION, 2000), diminuindo as forças de compressão e os movimentos de fricção. Isto facilitou a difusão do líquido sinovial, lubrificando e, assim, nutrindo a cartilagem e permitindo o deslizamento das superfícies. A natação também promoveu o fortalecimento da musculatura envolvida na dinâmica articular diminuindo , desta forma, a sobrecarga articular (CAMPION, 2000).

## 4 – CONCLUSÕES

Baseado nos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- a) a imobilização prolongada da articulação fêmoro-tíbio-patelar por 45 dias determina perda de proteoglicanos da matriz cartilaginosa, aumento do número de condrócitos, aumento da espessura da cartilagem calcificada, irregularidade da superfície articular, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular e aumento da espessura do osso subcondral;
- b) Como a degeneração demonstrada pelas células sinoviais, em decorrência da imobilização, resultam em diminuição da produção de fluido sinovial e redução do suprimento nutricional à cartilagem, tanto o exercício livre quanto o orientado influenciam positivamente no retorno das condições morfológicas da cápsula articular, anteriores a imobilização e,
- c) Os animais imobilizados e submetidos atividade livre e natação, apresenta um menor número de alterações tanto na cartilagem articular como no osso subcondral, quando comparados com aqueles animais que foram imobilizados e mantidos com atividade livre.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDT, K.D. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. **Arthritis & Rheumatism**, v.49, n. 2, p.267-271, 2003.

BURR, D.B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.0, p.1-11, 2004.

CAMPION, M. R. Os efeitos fisiológicos, terapêuticos e psicológicos da atividade aquática; Física básica: forma e densidade. In: Campion, M. R. **Hidroterapia princípios e prática**, São Paulo, Manole, p. 3-4 e 14-22, 2000.

COLLINS, K. Efeitos térmicos. In: Kitchen, S., Bazin, S. **Eletroterapia de Clayton**, São Paulo, Manole, 10 ed, p.89-104, 1998.

CULAV, E.M., CLARK, C.H., MERRILEES, M.J. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v.79, p.308-319, 1999.

EVANS, E.B., EGGERS, G.W.N., BUTLER, J.K. et al. Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.642A, n.5, p.737-58, 1960.

FINSTERBUSH, A., FRIEDMAN, B. Early changes in immobilized rabbits knee joints: a light and electron microscopic study. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v.92, p.305-19, 1973.

FRATESCHI, M.E.B.J.M. **Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso.** Ribeirão Preto. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2002.

FU, L.L.K., MAFFULLI, N., CHAN, K.M. Intra-articular hyaluronic knee immobilization for 6 weeks in rabbits. **Clinical Rheumatology**, v.20, p.98-103, 2001.

HALL, M.C. Cartilage changes after experimental immobilization of the joint of the young rat. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.45A, n.1, p.36-44, 1963.

HAAPALA, J., AROKOSKI, J.P., HYTTINEN, M.M. et al. Remobilization does not full restore immobilization induced articular cartilage atrophy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.362, p.218-229, 1999.

JAMES, C.B., UHLT, T.L. A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. **Journal of Athletic Training**, v.36, n.4, p.413-419, 2001.

LEROUX, M.A., CHEUNGT, H.S., BAU, J.L. et al. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.9, p.633-640, 2001.

NARMONEVA, D.A., CHEUNG, H.S., WANG, J.Y. et al. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.20, p.83-91, 2002.

PALMOSKI, M.J., BRANDT, K.D. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro. **Arthritis & Rheumatism**, v.27, p.675-681, 1984.

PALMOSKI, M.J. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. **Arthritis & Rheumatism**, v.24, p.1329-37, 1981.

PIERMATTEI, D.L., FLO, G.L. Artrologia. In: Piermattei, D.L., Flo, G.L. **Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais**, São Paulo, Manole, p.161-176, 1999.

RANDIN, E.L., ROSE, R.M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.213, p.34-40, 1986.

ROY, S. Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.29, p.634-642, 1970.

SALTER, R. B. Os princípios gerais e métodos específicos do tratamento músculo-esquelético, In: Salter, R. B. **Distúrbios e Lesões do Sistema Músculo-Esquelético**. Rio de Janeiro, Medsi, 2 ed, p.73-95, 1985.

THAXTER, T.H., MANN, R.A., ANDERSON, C.E. Degeneration of immobilized knee joints in rats. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.47A, n.3, p.567-85, 1965.

TROYER, H. The effect of short-term immobilization on the rabbit knee joint cartilage. A histochemical study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.107, p.249-257, 1975.

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

WHITING, W.C., ZERNICKE, R.F. Biomecânica e adaptação dos tecidos, In: \_\_\_ **Biomecânica da Lesão Musculoesquelética**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.83-105, 2001.