

Artigo original

Imobilização do tornozelo de ratos: estudo histológico da extremidade distal da tíbia

Immobilization of rats ankle: histological study of distal extremity of the tibia

Sônia Maria Marques Gomes Bertolini, Ft., D.Sc.*, Priscila Daniele de Oliveira, Ft.***, Deisy Carla Cararo, Ft.***

.....
Professora associada da Universidade Estadual de Maringá e do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR, Maringá PR, **Pós-graduação em Anatomia e Histologia pela Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá PR, Pós-graduação em Gestão da Saúde pela Universidade Estadual do Centro-oeste - UNICENTRO, Guarapuava PR, *Pós-graduação em Osteopatia pelo Instituto Docusse de Osteopatia e Terapia Manual - IDOT, Presidente Prudente SP*

Resumo

As articulações sinoviais têm como função a realização de movimentos e, quando permanecem imobilizadas, sua integridade fica prejudicada, mesmo em diferentes períodos de imobilização. O objetivo deste estudo foi analisar o comportamento das estruturas osteocartilaginosas da extremidade distal da tíbia após a imobilização do tornozelo de ratos. Para isso, utilizou-se 15 ratos *Wistar*, que foram divididos em 3 grupos, com 5 animais cada, sendo submetidos a imobilização por 14, 21 e 45 dias. Os controles dos experimentos foram obtidos através dos membros direitos dos respectivos animais. Estes foram eutanasiados e seus tornozelos foram submetidos à rotina histológica. A seguir procedeu-se a documentação em fotomicroscopia e as imagens foram analisadas de forma descritiva. Os resultados revelaram redução da massa óssea subcondral e aumento dos espaços trabeculares em todos os períodos de imobilização. Nos grupos experimentais de 21 e 45 dias houve diminuição da espessura das cartilagens articular e epifisária. Notou-se ainda no experimento de 45 dias um decréscimo no número de células cartilaginosas, formação de grupos isógenos e avanço do osso subcondral para a cartilagem articular. Com base nesses resultados, conclui-se que a imobilização por diferentes períodos provoca alterações estruturais osteocartilaginosas da extremidade distal da tíbia.

Palavras-chave: articulação do tornozelo, cartilagem hialina, imobilização.

Abstract

The synovial joints have as function to perform movements and, when immobilized, their integrity gets impaired, even in different periods of immobilization. Thus, the main objective of this study was to analyze the behavior of osteochondral structures of distal extremity of tibia after immobilization of rats' ankle. 15 Wistar rats were used on the study, which were divided into three groups, each one with five rats, being immobilized for 14, 21 and 45 days. The controlled experiments were obtained through the right side limbs of the respective animals, which were euthanized and their ankles underwent histological routine. Later, the documentation by photomicrograph was carried out and the images analyzed in a descriptive approach. Results revealed a reduction in subchondral bone mass and an increase of trabecular spaces in all periods of immobilization. On the 21 and 45-day experimental groups there was a reduction of the joint and epiphyseal cartilage. Moreover, on the 45-day experimental group, there was a decrease on the number of cartilage cells, formation of isogenous groups and progress of the subchondral bone to the articular cartilage. Based on the results, we conclude that immobilization in different periods, causes alterations in the osteochondral structures of distal extremity of the tibia.

Key-words: ankle joint, hyaline cartilage, immobilization.

Recebido 15 de setembro de 2010; aceito em 17 de janeiro de 2011.

Endereço para correspondência: Priscila Daniele de Oliveira, Rua Gonçalves Dias, 137, Vila Ivone Apucarana 86804-280, Tel: (43) 3423-2669, E-mail: prisciladanielefsio@hotmail.com

Introdução

Para o tratamento clínico das lesões no desporto, das doenças degenerativas articulares, das fraturas ósseas, das rupturas ligamentares ou das desnervações têm se buscado, a cada dia, o aperfeiçoamento de técnicas no intuito de proporcionar maior funcionalidade ao indivíduo. Contudo, ainda existem na prática médica situações em que se utiliza da imobilização de um segmento corporal, mesmo com o reconhecimento dos seus efeitos deletérios [1].

As consequências geradas no aparelho locomotor pela imobilização de um membro ou, mais especificamente, de uma articulação, podem ser evidenciadas como uma diminuição da elasticidade muscular, redução da amplitude de movimento e também como contraturas musculares e articulares [2-4].

Em geral, as articulações, como as sinoviais, são compostas por cartilagem articular, membrana sinovial, cavidade articular, ligamentos e líquido sinovial. Funcionalmente, são caracterizadas por apresentarem movimento e produção do líquido sinovial (sinóvia), que é indispensável para o seu melhor desempenho. A sinóvia é liberada conforme a movimentação da articulação e confere suprimento nutricional à cartilagem articular [5].

A articulação sinovial do tornozelo é frequentemente citada pela literatura como sendo uma das mais susceptíveis a lesões. Apesar de ser considerada mais estável do que móvel, ela está entre 15 a 25% das lesões musculoesqueléticas, geralmente apresentando-se como uma entorse de tornozelo, ou então, fratura maleolar [6,7].

Hamill e Knutzen [8] caracterizam a referida articulação como sendo constituída por ossos longos e curtos, cuja função é fornecer suporte de peso e dissipação de cargas, respectivamente. Quando um osso longo não sofre forças compressivas ou tensivas, ele pode ser prejudicado no seu papel. Comumente, a opção de tratamento para as lesões das estruturas do tornozelo é a imobilização [6]. Sendo assim, a tibia que é um osso longo, possivelmente torna-se mais vulnerável aos efeitos deletérios, quando submetida ao desuso [8].

Há autores que expõem em seus estudos, de forma minuciosa, as alterações ocorridas no músculo esquelético, mediante os diferentes períodos de pós-imobilização. Porém as modificações articulares também envolvidas na imobilização são, muitas vezes, superficialmente descritas [2,9,10].

Quando uma articulação é imobilizada, a efetividade da manutenção de sua cartilagem fica prejudicada, alterando a sua integridade. Com a redução da carga e do movimento, as células de crescimento do osso subcondral são acionadas, desencadeando uma invasão vascular para a cartilagem, acarretando fibrosamento, diminuição de proteoglicanos e da espessura cartilaginosa [11].

Independentemente do tempo de imobilização, seja a curto ou a longo prazo, as alterações articulares de um modo geral são bem evidenciadas. Brandt [12] relatou em seus estudos que, em poucas semanas, a espessura da cartilagem

teve uma redução de 50% em seu conteúdo de proteoglicanos, afetando as propriedades de rigidez e hidratação da cartilagem articular. Por outro lado, Carlo *et al.* [13] descrevem, em seus experimentos com imobilização de ratos por 45 dias, que foram encontradas alterações como espessamento e fibrosamento da cápsula articular com proliferação da membrana sinovial (apresentando rigidez e diminuição da amplitude de movimento articular), hiperplasia sinovial, o que possivelmente foi ocasionado pela redução da produção do fluido sinovial, gerando, conseqüentemente, a degeneração da cartilagem articular.

Com a redução da movimentação passiva e ativa da articulação, durante a imobilização, segundo Hagiwara *et al.* [4], pode-se desenvolver uma contratura articular. No entanto, sua origem é bem discutida, pois alguns pesquisadores acreditam que ela seja causada por fatores artrogênicos e outros por miogênicos. Neste último, são abordadas as lesões de músculos, tendões e fâscias. Já no primeiro caso, as alterações da cartilagem pela imobilização geram a limitação da movimentação passiva e ativa, sendo um fator de maior aceitação em função da contratura articular.

Alievi *et al.* [14] citam em seus experimentos com cães que, após 15 dias de imobilização, já existe uma perda estatisticamente significativa na flexão e na extensão da articulação tíbio-tarsal e que, mesmo sendo uma imobilização temporária, ocorrem disfunções importantes na homeostase articular. Além disso, salientam que os animais sentiram dores durante a mobilização passiva da articulação, possivelmente pelo tempo de imobilização, que resultou em atrofia muscular, contratura da musculatura e da cápsula articular, proliferação de tecido conectivo intracapsular e formação de aderências.

Conforme estudos realizados por Ferreira *et al.* [15], em casos de luxação subtalar, existe perda expressiva em até 50% da mobilidade articular do pé e do tornozelo após imobilização de 17 a 48 semanas. Os autores atribuíram isso ao dano à cartilagem articular no momento da luxação, à fibrose cicatricial periarticular e, principalmente, à imobilização, que, nos traumas de maior energia, teve seu período prolongado.

Existem pesquisas que analisam os efeitos da imobilização e da remobilização de um membro para verificar as formas que menos agridam os tecidos envolvidos durante o período de desuso. Todavia, o programa de reabilitação funcional do membro imobilizado deve ser cuidadosamente estudado, sendo que uma remobilização mal estruturada pode desencadear prejuízos à cartilagem articular, assim como foi descrito por Portinho *et al.* [16]. Entretanto, ainda há poucos trabalhos que descrevem detalhadamente os efeitos da imobilização sobre as estruturas articulares, principalmente dos membros inferiores, que estão mais sujeitos a descarga de peso.

Neste sentido, este estudo teve como objetivo analisar o comportamento das estruturas osteocartilaginosas da extremidade distal da tibia após a imobilização do tornozelo de ratos, por diferentes períodos, no intuito de contribuir para

a adoção de terapêuticas melhor embasadas nas propriedades biomecânicas do tecido ósseo.

Material e métodos

O experimento foi realizado utilizando-se de 15 *Rattus navegicus albinus* machos, variedade *Wistar* (3 a 4 meses, 250-300 g), que ficaram divididos em três grupos, com cinco animais cada (grupos I, II e III), sendo o primeiro grupo submetido à imobilização por 14 dias, o segundo por 21 dias e o terceiro por 45 dias. O controle do experimento foi obtido através do membro contralateral direito do respectivo animal. O protocolo para esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Bioética Animal do Centro Universitário de Maringá (COBAC), sob o número 046/2008.

Os animais permaneceram no biotério do CESUMAR, mantidos em gaiolas de polipropileno com 39 cm de comprimento, 32 cm de largura e 16 cm de altura, forradas com cepilho de madeira. Após o experimento, os ratos ficaram alojados em duplas nas gaiolas. O ambiente era higienizado de acordo com os procedimentos do laboratório, com o controle da temperatura a 25°C e da luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro). A água e a ração estavam livremente acessíveis.

Para a realização do experimento, os animais foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg⁻¹) e Cloridrato de Xilazina (10 mg/kg⁻¹), de forma associada, com o volume de 0,1mL para cada 100 gramas de peso, por via intraperitoneal. A imobilização era feita no membro posterior esquerdo, através de uma tala de alumínio adaptada ao membro a ser imobilizado. A posição escolhida para a imobilização foi a extensão do joelho e a flexão dorsal do tornozelo esquerdo em 90° do respectivo segmento corporal [17,18].

Durante o período em que os ratos permaneceram imobilizados, eles foram visitados diariamente, para que ocorresse o acompanhamento do estado geral do membro com restrição da mobilidade.

Após o período experimental, cada animal foi eutanasiado de acordo com as suas fases de imobilização, utilizando uma dosagem letal de Tiopental Sódico 45mg/kg de peso (1g) diluído em água (22 ml), por via intraperitoneal. Em seguida, ocorreu a desarticulação da articulação coxo-femoral para a coleta do material, que foi colocado em formol 10% para ser levado ao tratamento histológico. As articulações do tornozelo direito (grupo controle) e esquerdo (grupo experimental) de todos os animais foram coletadas e a preparação do material iniciou-se imediatamente após sua coleta [17,18].

As peças foram lavadas em solução salina 0,9% e, em seguida, fixadas em solução de formol a 10% durante 48 horas, até o início do tratamento histológico de rotina. Após, ocorreu a desidratação em série crescente de alcoóis, a diafanização com xileno e a inclusão de parafina. Foram utilizados cortes de 6µm de espessura, seriados e orientados longitudinalmente em relação ao maior eixo do osso. Os cortes obtidos foram corados de forma alternada e em sequência, pelo método

Hematoxilina Eosina – HE, sendo depois fixados com resina Permont.

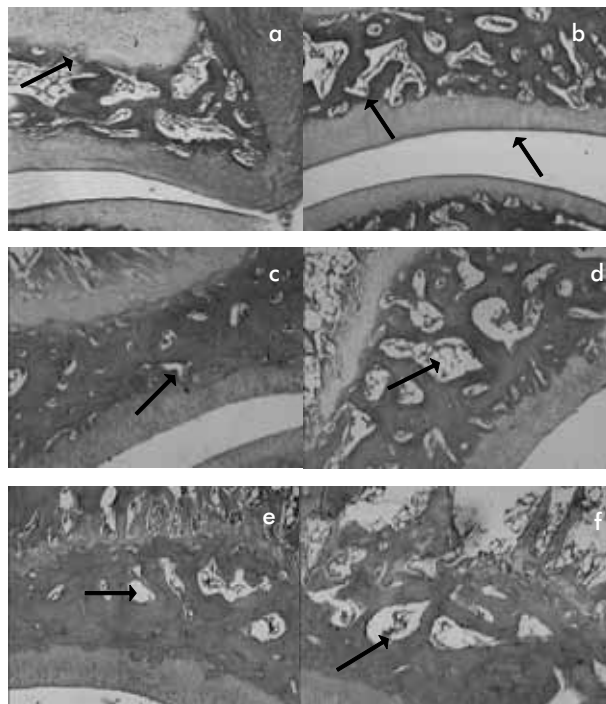
Posteriormente, para o estudo histológico, o material foi analisado em microscópio óptico Olympus BX40 e fotografado em fotomicroscópio BX50, com equipamento fotográfico PM10AK, com o objetivo de observar as alterações celulares, o aspecto trabecular do osso subcondral, as irregularidades da cartilagem articular e da cartilagem epifisária da extremidade distal da tíbia.

Em seguida, os achados histológicos foram submetidos a uma análise descritiva.

Resultados

Foi observada, em todos os períodos de imobilização, a redução da massa óssea subcondral, com aumento sensível dos espaços trabeculares da extremidade distal da tíbia (Figura 1).

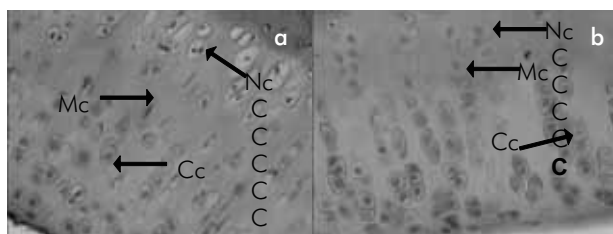
Figura 1 - Fotomicrografias de seções longitudinais de 6 µm das epífises distais das tíbias, com visualização dos espaços trabeculares do osso subcondral (seta). a); c); e) Grupo controle dos animais imobilizados 14, 21 e 45 dias, respectivamente. b); d); f) Grupo experimental dos animais imobilizados 14, 21 e 45 dias, respectivamente. HE, 124X.



Com relação à cartilagem articular do grupo experimental, houve nos períodos de 21 e 45 dias de imobilização uma pequena diminuição da espessura, se comparado ao grupo controle. Nos períodos de 14 e 21 dias de imobilização não foram identificadas alterações pertinentes à constituição da referida cartilagem. Sobretudo, na imobilização de 45 dias, ocorreu uma diminuição no número de células cartilaginosas

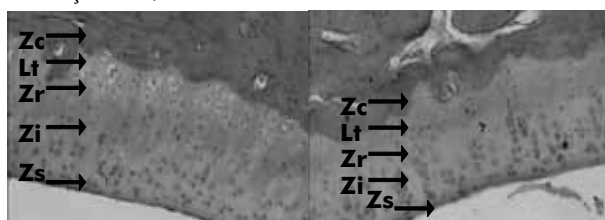
na região próxima ao osso subcondral. No entanto, pôde-se observar um aumento dessas células na região próxima à face articular, formando grupos de condrócitos, conhecidos também como grupos isógenos (Figura 2).

Figura 2 - Fotomicrografias de seções longitudinais de 6 μm das epífises distais das tíbias, com visualização do número de células cartilaginosas (Nc), a matriz cartilaginosa (Mc) e os condrócitos (Cc). a) Grupo controle de 45 dias de imobilização. b) Grupo experimental de 45 dias de imobilização. HE, 620X.



Na cartilagem articular do grupo experimental de 45 dias, notou-se um avanço da linha de transição osteocartilaginosa, com progressão do osso subcondral para algumas regiões dessa cartilagem (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografias de seções longitudinais de 6 μm das epífises distais das tíbias, com visualização da cartilagem articular: zona superficial (Zs), zona intermediária (Zi), zona radial (Zr), linha de transição (Lt) e zona de calcificação (Zc); a) Grupo controle de 45 dias de imobilização. b) Grupo experimental de 45 dias de imobilização. HE, 310X.



Quanto à cartilagem epifisária ou de crescimento, nos animais imobilizados por 21 e 45 dias, houve uma importante redução da espessura dessa cartilagem, com notável diminuição do número de condrócitos (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Fotomicrografias de seções longitudinais de 6 μm das epífises distais das tíbias, com visualização da espessura da cartilagem epifisária (traço) e concentração de condrócitos (círculo). a) Grupo controle de 21 dias de imobilização. b) Grupo experimental de 21 dias de imobilização. HE, 310X.

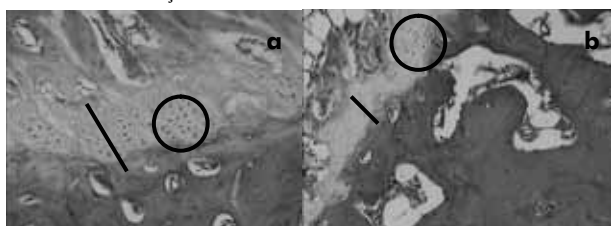
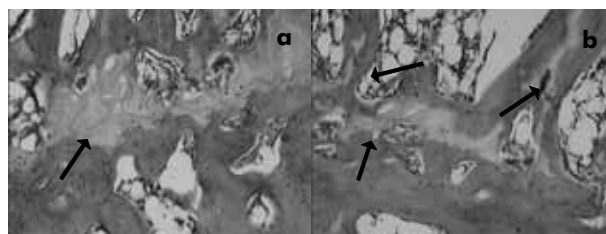


Figura 5 - Fotomicrografias de seções longitudinais de 6 μm das epífises distais das tíbias, com visualização da cartilagem epifisária emaranhada ao osso esponjoso (setas). a) Grupo controle de 45 dias de imobilização. b) Grupo experimental de 45 dias de imobilização. HE, 310X.



Verificou-se também que essas células cartilaginosas encontravam-se emaranhadas e distribuídas irregularmente na região da metáfise, com maior evidência no experimento de 45 dias (Figura 5).

Quando comparados os grupos experimentais de 21 e 45 dias de imobilização, nota-se que o número de condrócitos e a espessura da cartilagem epifisária sofreram nítido decréscimo, concomitante ao prolongamento do tempo em que os animais ficaram imobilizados.

Discussão

As alterações observadas no grupo experimental de 14 dias, no que se refere à massa óssea subcondral, possivelmente deveu-se ao seu desuso durante o período de imobilização, o que pode ser sustentado por Trebacz e Zdunek [19] em estudos realizados com ratos adultos jovens, que foram imobilizados por duas semanas, com a ocorrência de alterações significativas na massa e na densidade óssea. Tal fato é corroborado por Portinho *et al.* [16], que também descrevem a diminuição de osteócitos nos ossos do tornozelo de ratos, como o único achado alterado por um período de imobilização de 15 dias.

Nos experimentos de 21 dias e 45 dias, ocorreu uma perda progressiva do osso subcondral, que se tornou cada vez menos consistente e com um aumento do espaço trabecular, caracterizando um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Nesse sentido, Valpon *et al.* [20] imobilizaram ratos por 28 dias e elucidaram a ocorrência desse fato pela falta de solicitação mecânica durante o desuso do membro. Para esses autores, o prolongamento do tempo de imobilização é proporcional ao aumento do enfraquecimento do tecido ósseo, desencadeado por uma reabsorção óssea adaptativa.

Não ocorreram alterações expressivas na cartilagem articular dos animais de duas semanas de imobilização, assim como citam Finsterbush e Friedman [21] e Paukkonen *et al.* [22]. Nos estudos realizados pelos referidos autores, houve a preservação da superfície articular em grupos de animais imobilizados por 5, 30 e 120 dias. No entanto, Bertolini *et al.* [17] relataram a diminuição estatisticamente significativa da espessura da cartilagem articular do joelho de ratos imobilizados por 7 e 14 dias. Vale ressaltar que estes achados

foram referentes à articulação do joelho, com características biomecânicas diferentes do tornozelo.

Entretanto, no experimento de 45 dias, analisado no presente estudo, observou-se grupos de condrócitos, que possivelmente revelam um estágio mais avançado da histogênese da cartilagem hialina, uma vez que Junqueira e Carneiro [23] descrevem que a cartilagem é formada a partir do mesênquima. Assim, ocorre uma multiplicação celular, formando um tecido rico em células que, devido à produção da matriz cartilaginosa, sofrem um afastamento. Estes condrócitos, por sua vez, multiplicam-se por mitose, dando origem aos grupos isógenos.

Carlo *et al.* [13] também descrevem esse achado em suas pesquisas, realizadas com ratos imobilizados por 45 dias, salientando a presença intensa de condrócitos nas zonas superficial e intermediárias dessa cartilagem observando também a presença de grupos isógenos nessas regiões.

Ao retirar a carga do membro com a imobilização, há um retardo da manutenção da cartilagem articular. Com isso, o osso subcondral torna-se mais ativo, provocando invasões nessa cartilagem, seguindo em direção ao espaço articular, desencadeando a degeneração articular [24]. Outros autores, como Amatuzzi e Carazatto [25] também consideram que a eliminação das cargas impostas sobre a articulação prejudicam as trocas metabólicas, decisivas para a sobrevivência da cartilagem, o que leva à degradação desse tecido, desenvolvendo uma osteoartrose, provavelmente irreversível. Nos períodos de 14 e 21 dias de imobilização, utilizados neste experimento, não foi possível comprovar esse fato. No entanto, a imobilização de 45 dias apresentou uma razoável invasão de osso subcondral, sendo verificado pela incursão da linha de transição osteocartilaginosa sobre a cartilagem articular. Carlo *et al.* [13] corroboram que a imobilização prolongada, especialmente acima de 45 dias, interfere negativamente na nutrição sinovial à cartilagem articular, provocando a degeneração da mesma.

Destaca-se, ainda, que a cartilagem epifisária foi sensivelmente prejudicada, com depreciação da espessura, da distribuição e população condral. Contudo, Bertolini *et al.* [17] demonstram que houve um aumento da cartilagem epifisária em uma e duas semanas de imobilização. Os referidos autores atribuem esses resultados a uma resposta protetora da cartilagem, que realizou mais divisões mitóticas do que o normal, gerando grupos isógenos, com duas ou mais divisões, providas de um mesmo condrócito, no intuito de reparar o dano gerado pelo desuso articular. Novamente, vale ressaltar a utilização do joelho por Bertolini *et al.* [17] no estudo experimental sobre a restrição da mobilidade e que os animais de seus experimentos ficaram imobilizados por um período de até 14 dias, assim como vale salientar que esses achados revelaram uma resposta apenas imediata à imobilização. Tal fato também é apresentado por Piermattei e Flo [26], que consideram esse reparo como insignificante, conforme a continuidade da injúria tecidual.

Com o adelgaçamento e a destruição da cartilagem epifisária demonstrados, presume-se que a imobilização, ao interferir na conservação da integridade cartilaginosa, promoveu diminuição de proteoglicanos, aumento da ossificação subcondral, desidratação cartilaginosa [11] apoptose de condrócitos, atrofia e reabsorção da cartilagem [25], ocasionando assim uma união precoce da diáfise com a epífise distal, o que pode comprometer o crescimento do membro.

Nesse contexto, a persistência da imobilização por até 45 dias demonstrou prejuízos progressivos à articulação, e mesmo que a imobilização seja periódica ou de curta duração, a mesma pode inferir em perdas articulares de caráter cumulativo [25].

Conclusão

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que a imobilização por diferentes períodos provoca alterações estruturais osteocartilaginosas, evidenciadas pelo aumento dos espaços trabeculares do osso subcondral, assim como pela redução das espessuras das cartilagens articular e epifisária, demonstrando assim os efeitos deletérios da restrição da mobilidade articular também para a articulação do tornozelo. Conclui-se, ainda, que a imobilização interfere no processo de formação óssea e na histogênese da cartilagem hialina. Tendo em vista a calcificação precoce da cartilagem epifisária em decorrência da imobilização, sugere-se a realização de novas pesquisas que analisem o tecido ósseo da metáfise, frente às forças tensivas e compressivas impostas ao sistema esquelético pós-imobilização.

Agradecimentos

Agradecimentos às técnicas Vanessa Medeiros e Karina C. de Souza (Laboratório de Farmacodinâmica-CESUMAR), Cleonira Sarro (Laboratório de Anatomia-UEM) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do CESUMAR.

Referências

1. Dias CNK, Silva CA, Guirro R, Cancelliero KM, Chingui LJ. Imobilização em flexão plantar do tornozelo induz alteração metabólica em músculo esquelético de ratos. *Fisioter Bras* 2005;6(4):277-80.
2. Duringan JLQ, Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da estimulação neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. *Rev Bras Fisioter* 2006;10(3):297-302.
3. Duringan JLQ, Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Dias CNK. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica. *Fisioter Pesqui* 2006;13(2):31-6.
4. Hagiwara Y, Saijo Y, Chimoto E, Akita H, Sasano Y, Matsumoto F. Increased elasticity of capsule after immobilization in

- a rat knee experimental model assessed by scanning acoustic microscopy. *Ups J Med Sci* 2006;111(3):303-13.
5. Bertolini SMMG, Miranda Neto MH. Sistema articular. In: Miranda Neto MH, et al. *Anatomia Humana: aprendizagem dinâmica*. Maringá: Clichet; 2006. p. 99-101.
 6. Moreira V, Antunes F. Entorse do tornozelo do diagnóstico ao tratamento: perspectiva fisiatrica. *Acta Med Port* 2008;21(3):285-92.
 7. Schwartzmann CR, Werlang PM, Rubin LA, Carvalho LF, Gioscia JR, Slonka R. Tratamento conservador das fraturas maleolares do tornozelo tipo B de Weber. *Rev Bras Ortop* 2006;41(9):366-72.
 8. Hamill J, Knutzen KM. *Bases biomecânicas do movimento*. São Paulo: Manole; 1999.
 9. Lima SC, Caierão QM, Durling J, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter* 2007;14(4):297-302.
 10. Matheus JPC, Gomide LB, Milani, GJO, Shimano AC. A imobilização gessada por um curto período pode influenciar nas propriedades biomecânicas do músculo esquelético? *Brazilian Journal of Biomotricity* 2007;1(2):28-33.
 11. Belloti JC, Faloppa F. Tratamento clínico da osteoartrose: evidências atuais. *Rev Bras Ortop* 2006;41(3):47-53.
 12. Brandt KD. Response of joint structures to inactivity and to re-loading after immobilization. *Arthritis Rheum* 2003;49(2):267-71.
 13. Carlo RJ, Galvão MIV, Vitoria AJ, Natali ALT, Barbosa BS, Monteiro LCP. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007;59(2):363-70.
 14. Alievi MM, Schossler JE, Teixeira MW. Goniometria da articulação tíbio-tarsal após imobilização temporária com fixador esquelético externo em cães. *Ciênc Rural* 2004;34(2):425-8.
 15. Ferreira RC, Costa MT, Corrales CAI. Luxação peritalar: aspectos epidemiológicos e resultados do tratamento a médio prazo. *Rev Bras Ortop* 2006;41(4): 98-108.
 16. Portinho D, Boin VG, Bertolini GRF. Efeitos sobre o tecido ósseo e a cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos. *Rev Bras Med Esporte* 2008;14(5):408-11.
 17. Bertolini SMMG, Cararo DC, Oliveira PD, Tamyozo MF. Resposta das estruturas articulares do joelho de ratos pós-imobilização. *Rev Ciênc Saúde* 2009;2(1):8-15.
 18. Bertolini, SMMG, Cararo DC, Oliveira PD. Estudo morfo-métrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular. *Acta Sci Health Sci* 2009;31:15-8.
 19. Trebacz H, Zdunek A. Three-point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization. *J Biomech* 2006;39(2):237-45.
 20. Volpon JB, Cecim PES, Miyase CI, Gava NF. Alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. *Rev Bras Ortop* 2008;43(10):442-51.
 21. Finsterbush A, Friedman B. Early changes in immobilized rabbits knee joints: a light and electron microscopic study. *Clin Orthop Related Res* 1973;92:305-19.
 22. Paukkonen K, Helminen HJ, Tammi M, Jurvelin J, Kiviranta I, Saamanen AM. Quantitative morphological and biochemical investigations on the effects of physical exercise and immobilization on the articular cartilage of young rabbits. *Acta Biol Hung* 1984;35:293-304.
 23. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999.
 24. Camanho GL. Tratamento da osteoartrose do joelho. *Rev Bras Ortop* 2001; 36(5):285-9.
 25. Amatuzy MM, Carazatto JG. *Medicina do esporte*. São Paulo: Roca; 2004.
 26. Piermattei DL, Flo GL. *Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais*. São Paulo: Manole; 1999.
-