

Artigo original

Aspectos histológicos da epífise de crescimento ósseo em resposta ao exercício físico extenuante em camundongos

Histologic aspects of bone growth epiphysis after strenuous physical exercise in mice

Bruno Costa David*, Leila Correa de Albuquerque Feijó**

.....
**Fisioterapeuta do Hospital Geral Ana Nery, **Fisioterapeuta do Hospital Geral Roberto Santos e Professora da Universidade Católica do Salvador (UCSAL)*

Resumo

Procurou-se identificar se existe alteração histológica na epífise de crescimento ósseo de camundongos submetidos a exercício físico extenuante. Para tanto, foi realizada uma pesquisa experimental com uma amostra de 8 camundongos, que ficaram em condições ambientes em um biotério, alimentados com água e ração comum, ad libitum. A ninhada foi dividida em dois grupos, um grupo controle e um grupo experimental, sendo que, o grupo experimental foi submetido a um exercício físico extenuante, caracterizado pelo aumento do nível de ácido láctico sanguíneo, realizado por 40 minutos/dia, durante 20 dias ininterruptos. Ao final da intervenção, foram confeccionadas lâminas histológicas, com cortes longitudinais do fêmur dos camundongos e analisadas em um microscópio óptico. Os dados obtidos mostraram alteração na estrutura epifisária do grupo experimental com aparente diminuição da zona proliferativa do disco epifisário, articulação mais desenvolvida e aumento das espículas ósseas com diminuição das trabéculas, sugerindo uma maturação precoce da epífise de crescimento. Através da análise dos resultados, conclui-se que o exercício físico extenuante modifica a estrutura da epífise de crescimento ósseo em camundongos.

Palavras-chave: epífise, exercício físico, crescimento ósseo.

Abstract

The aim of this study was to identify histological alterations in bone growth epiphysis of mice submitted to a tiring physical exercise. For so, it was carried out an experimental research with a sample of 8 mice that stayed in environment conditions, fed with water and common feed, ad libitum. The brood was divided in two groups, a control group and an experimental group, being the experimental group submitted to a tiring physical exercise, characterized by the increasing of blood lactate level, carried out by 40 minutes/day, during 20 days uninterrupted. At the end of the intervention, were confectioned histological slides corresponding to the bone growth epiphysis of the femur of the mice and analyzed in an light microscope. Data showed an alteration in the epiphysis structure in the experimental group, with apparent decrease of the proliferation zone of epiphysis disc, an articulation more evolution and an increase of bone specula's with a decrease of trabeculae, what suggests an early maturation, accelerating the substitution of cartilaginous woven by bone weave. Through the analysis of the results, it was concluded that the tiring physical exercise modifies the structure of bone growth epiphysis in mice.

Key-words: epiphysis, physical exercise, mice.

Recebido em 15 de outubro de 2007; aceito em 13 de janeiro de 2009.

Endereço para correspondência: Bruno Costa David, Largo da Soledade, 21 Soledade 40325-090 Salvador BA, E-mail: brunocdavid@hotmail.com; Leila de Albuquerque, Rua Ceará, 35/701 Pituba 41830-451 Salvador BA, E-mail: proleila@hotmail.com, Tel: (71) 33461 255/9112 9995

Introdução

O osso desenvolve-se diretamente do mesoderma pela deposição de sais minerais, processo denominado ossificação intramembranosa, ou em modelo cartilaginosa previamente formado, ao que se chama ossificação endocondral. As regiões onde o osso começa a ser depositado são conhecidas como centros de ossificação, e a partir destes, o processo de ossificação alastra-se. A porção de um osso longo, formado a partir do centro primário é chamada diáfise, enquanto àquela formada a partir do centro secundário, chama-se epífise. É na placa de cartilagem entre essas duas regiões, a placa epifisária de crescimento, onde a diáfise continua a crescer em comprimento, em razão da multiplicação das células cartilaginosa. Com o crescimento ósseo, a camada mais profunda das células condrais é gradualmente calcificada e substituída por osso. Quando esta placa desaparece, a diáfise e a epífise se fundem e o crescimento do osso cessa [1].

Fatores nutricionais, genéticos, mecânicos e hormonais influenciam no crescimento ósseo. Dentre os mecânicos, o exercício físico destaca-se, exercendo uma força de tração muscular sobre o osso. O exercício físico age no sistema endócrino, aumentando a secreção do GH, do TSH, da prolactina e de endorfinas na hipófise anterior. Na hipófise posterior, age aumentando a vasopressina, e na córtex supraespinhal aumenta os níveis de cortisol, corticosterona, e aldosterona. No pâncreas, o exercício físico age diminuindo a secreção da insulina além de promover aumento da adrenalina e noradrenalina na medula supra-espinhal, da tiroxina (T_4) e da triiodotironina (T_3) na tireóide e do glucagon no pâncreas. O paratormônio sofre alterações com o exercício físico, pelo aumento de seus níveis na paratireóide, bem como o estrogênio e a progesterona nos ovários, a testosterona nos testículos e a renina nos rins [2].

Atividade física é entendida como qualquer movimento corporal produzido por músculos e que resulta em maior dispêndio de energia, enquanto que exercício físico é a atividade física planejada, estruturada, repetitiva e proposital [3]. O exercício pode ser classificado em leve, moderado ou extenuante, conforme intensidade, frequência e duração do treinamento e relação aptidão física/treinamento, que são fatores que influenciam significativamente as alterações fisiológicas e humorais. O exercício físico extenuante caracteriza-se pela elevação do nível de ácido láctico sanguíneo e aumenta a probabilidade de lesão dos ossos, articulações e músculos [2], sabendo-se que o exercício moderado para um atleta pode ser extenuante para um sedentário, devido à falta de condicionamento físico.

A divulgação dos benefícios à saúde é o principal incentivo à inclusão do exercício físico no cotidiano das pessoas. Fatores estéticos também levam muitos jovens, com a epífise de crescimento ósseo ainda presente, à exposição prolongada a exercícios físicos sem critérios mínimos no que se refere à duração e a intensidade dos mesmos, muitas vezes excedendo prováveis parâmetros do que seria a normalidade.

Durante o processo de maturação esquelética, a epífise de crescimento encontra-se presente, e acredita-se que nesta fase o exercício físico moderado promova um maior crescimento ósseo. Por outro lado, o treinamento físico extenuante atenua este crescimento, sendo este efeito mais vinculado à intensidade e duração do treino, do que ao tipo de exercício. Tem sido sugerido que o máximo de treinamento físico semanal seja de 15 a 18 horas, quando se trabalha com pré-púberes e púberes, para que sejam evitados comprometimentos no crescimento [4].

As limitações para se desenvolver uma pesquisa experimental sobre este tema em seres humanos envolvem, sobretudo, aspectos éticos, o que implica na escolha de animais na composição de amostras para estudo. Um levantamento em bases de dados da literatura científica mostrou que ratos e camundongos são os animais mais usados em pesquisas experimentais [5], já que dos 731 genes identificados no cromossomo dos roedores, apenas 14 não apresentaram nenhuma contrapartida humana. Isto reforça a validade do uso de camundongos como modelos para uma melhor compreensão das funções dos genes humanos [6].

A proposta desse estudo é observar se há modificação na estrutura da placa epifisária de camundongos quando submetida a um exercício físico extenuante.

Material e métodos

Foi realizada uma pesquisa experimental com uma amostra de 8 camundongos, da raça *mus musculus*, correspondente a uma ninhada, com 30 dias de nascidos, correspondente à idade púber, que ficaram a condições ambiente, no biotério do Laboratório de Estudo do Meio Ambiente, na Universidade Católica do Salvador.

O experimento foi realizado no período de agosto a outubro de 2005. A ninhada, que foi alimentada com água e ração comum, ad libitum, foi dividida aleatoriamente, pelo método de sorteio simples, em 2 grupos iguais, um grupo controle (GC) e um grupo experimental (GE).

O grupo controle não foi submetido a nenhum tipo de intervenção, enquanto que o grupo experimental foi submetido a um exercício físico extenuante. Os camundongos do GE foram colocados dentro de uma bacia com o nível de água superior à suas estaturas, com uma anilha de chumbo de peso equivalente a 50% do peso corporal de cada animal, presa à porção proximal da cauda. O peso utilizado foi modificado diariamente antes de cada intervenção, de acordo com a variação do peso corporal de cada camundongo do GE, mantendo constante a relação de 50% do peso corpóreo. Nestas condições, os camundongos foram levados a pular continuamente, sendo assim constituídas as intervenções, de modo que cada animal do GE foi submetido do trigésimo ao quinquagésimo dia de nascido, a 40 minutos de exercício diário, durante 20 dias ininterruptos. A intensidade de execução do exercício físico foi estipulada de acordo com um estudo piloto, que foi realizado através do método enzimático colorimétrico para a

determinação do lactato. Este estudo, realizado ao final dos 40 minutos de intervenção, comprovou, no camundongo submetido ao estímulo físico proposto para o estudo, nível de ácido lático sanguíneo aumentado em 5 vezes, comparado ao encontrado no sangue do camundongo não estimulado.

Ao final dos 20 dias de intervenção, cada animal foi profundamente anestesiado pela inalação de éter sulfúrico. Em seguida, foi dissecado o fêmur direito de cada camundongo e fixado com formol a 10% em tubos de ensaio. Após 2 dias de imersão, cada peça foi descalcificada em solução diluída de ácido nítrico, e desidratada em seqüência gradual de álcool. As peças foram diafanizadas com xilol e inclusas em parafina.

Foram realizados cortes longitudinais do fêmur utilizando micrótomo e cada peça foi hidratada em seqüência decrescente gradual de álcool, sendo corada com hematoxilina eosina (HE), confeccionando-se assim, as lâminas histológicas. Com o emprego destas lâminas foi realizada uma análise qualitativa ao nível de microscopia óptica. Nesta análise foram observadas estruturas ósseas e cartilaginosas.

O estudo foi realizado em camundongos de acordo com o Projeto de Lei nº. 1.153-A, de 1995 (Apenso o PL 3.964, de 1997), que regulamenta o inciso VII, do parágrafo 1º do artigo 225, da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.

Resultados

Foi observada alteração na estrutura epifisária dos camundongos do GE, quando comparada com a epífise de crescimento do GC. Na lâmina histológica da placa epifisária do fêmur de cada camundongo do GE foi observado maior desenvolvimento da articulação do joelho (Figura 1), uma diminuição da zona proliferativa do disco epifisário (Figura 2), e um aparente aumento das espículas ósseas e diminuição das trabéculas (Figura 3), quando comparadas com as lâminas do GC (Figuras 4, 5 e 6). Observou-se também uma aparente equidade quanto ao número de células ósseas e cartilaginosas entre o GE e o GC.

Ao se comparar as lâminas de cada animal do grupo controle entre si, foi observada uma aparente similaridade em número e volume, tanto das células condrais, como das células ósseas. O mesmo foi observado, quando analisadas as lâminas do grupo experimental entre si, constatando que não há uma diferença significativa entre as amostras de animais de um mesmo grupo.

Figura 1 - Articulação do joelho GE.



Figura 2 - Zona proliferativa do disco epifisário do GE.

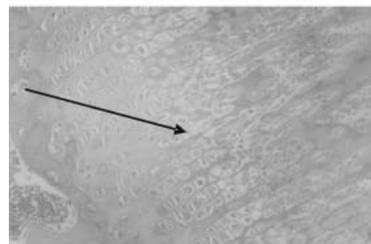


Figura 3 - Espículas ósseas e trabéculas do GE.

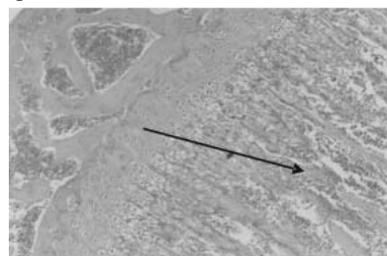


Figura 4 - Articulação do joelho GC.

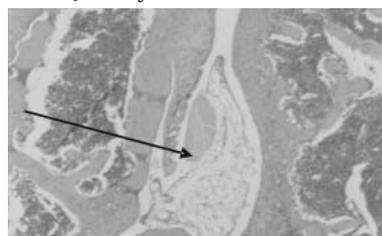
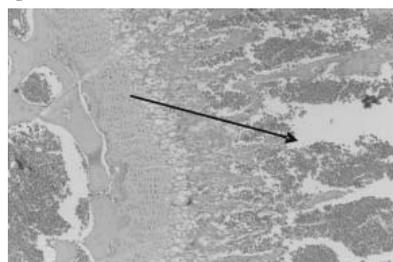


Figura 5 - Zona proliferativa do disco epifisário do GC.



Figura 6 - Espículas ósseas e trabéculas do GC.



Discussão

Durante o processo de maturação, a placa epifisária, responsável pelo crescimento longitudinal do osso, e localizada entre a epífise e a diáfise, é substituída por tecido ósseo, estagnando o crescimento longitudinal, e mantendo desta forma o comprimento do osso inalterável fisiologicamente [1]. Nos camundongos submetidos ao exercício físico extenuante, a placa epifisária do fêmur apresentou alterações histológicas,

com uma diminuição aparente da zona proliferativa do disco epifisário, articulação do joelho mais desenvolvida, e um aparente aumento das espículas ósseas com diminuição das trabéculas. A partir do conhecimento dos processos fisiológicos que ocorrem na placa epifisária durante sua maturação, estes resultados sugerem uma maturação precoce desta estrutura.

Huang [7] realizou um estudo com ratos, dividindo sua amostra em três grupos, o primeiro grupo realizou natação, o segundo, corrida e o terceiro foi o grupo controle. Comparando as alterações ósseas após 8 semanas de intervenção, o autor concluiu que diferentes modalidades de exercícios podem trazer benefícios às propriedades mecânicas do osso. Bourrin [8] realizou um estudo experimental, que mostrou uma redução no crescimento longitudinal do osso de ratos jovens submetidos à corrida, caracterizada como exercício físico extenuante pelo consumo máximo de oxigênio. Em sua análise histológica observou uma diminuição das trabéculas ósseas na tíbia, e uma perda de densidade mineral à densitometria óssea. Aspectos histológicos semelhantes foram encontrados no fêmur dos camundongos do GE neste estudo.

Em estudo com atletas de diferentes modalidades esportivas, Da Silva [4] mostrou que o tipo de esporte praticado não interfere no crescimento do indivíduo, estando a potencialização ou comprometimento do crescimento longitudinal do osso relacionados com a duração, a intensidade e a frequência do treinamento, parâmetros estes que caracterizam o exercício físico como moderado ou extenuante. A alteração na produção do hormônio de crescimento (GH) é a variável que determina a otimização ou declínio do crescimento ósseo. O exercício físico moderado eleva os níveis de GH no organismo, levando a um aumento no crescimento, enquanto que, o exercício físico caracterizado como extenuante diminui a produção deste hormônio, atenuando o crescimento. Os resultados encontrados nas epífises de crescimento dos camundongos submetidos a um exercício físico extenuante indicam uma maturação precoce da placa epifisária, sugerindo uma diminuição no crescimento ósseo longitudinal. As espículas mais desenvolvidas, nas lâminas do fêmur dos camundongos do GE, como pode ser observado no presente estudo, sugerem um osso mais maduro.

Notomi [9], realizando um estudo para determinar os efeitos dos exercícios de resistência no osso, com estímulo elétrico, submeteu ratos a saltos diários de uma hora, durante quatro semanas. Foram observados aumento na massa, na força e na formação óssea. Singh [10] obteve resultados equivalentes num estudo experimental, ao impor exercícios de alto impacto a ratos, também com pulos. Ao final da intervenção, houve aumento de osso cortical e uma melhor formação do perióstio nos grupos dos animais que realizaram o treinamento. Semelhantes alterações foram observadas nas lâminas histológicas do fêmur dos camundongos do GE, como aumento das espículas ósseas.

Apesar deste estudo não ter mensurado o comprimento ósseo ao final da intervenção, as alterações observadas nas lâminas histológicas sugerem uma diminuição no crescimento

longitudinal do osso em camundongos jovens submetidos a um exercício físico extenuante.

Conclusão

A análise microscópica de lâminas histológicas, confeccionadas a partir de segmentos do tecido ósseo da placa epifisária do fêmur de camundongos, submetidos a um exercício físico extenuante, sugere uma maturação precoce da epífise de crescimento. Foram observadas alterações, com aparente diminuição da zona proliferativa do disco epifisário, aparente aumento das espículas ósseas e diminuição das trabéculas, além de articulações mais desenvolvidas.

Apesar das significativas alterações encontradas na estrutura epifisária do fêmur no GE, outros estudos são necessários para melhor entendimento deste processo e suas repercussões no organismo.

Agradecimentos

Agradecemos à Professora Roseli Fernandes Oliveira, ao Laboratório de Estudos do Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Católica de Salvador, na pessoa da Professora Luzimar Fernandes Gonzalez, e em especial ao monitor de histologia Pompilho Régis Carneiro Silva, pelo apoio fundamental neste trabalho.

Referências

1. Palastanga N, Field D, Soames R. Introdução. Anatomia e movimento humano: Estrutura e Função. São Paulo: Manole; 2000. p.1-24.
2. Mcardle WD, Katch FI, Katch VL. Treinamento para potência anaeróbica e aeróbica. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.373-393.
3. Mcardle WD, Katch FI, Katch VL. Atividade física, saúde e envelhecimento. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.605-635.
4. Da Silva CC et al. O exercício físico potencializa ou compromete o crescimento longitudinal de crianças e adolescentes? Mito ou verdade? Rev Bras Med Esporte 2004;10:520-4.
5. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. Acta Cir Bras 2004;19:59-65.
6. Copeland NG, Jenkins NA, O'Brien SJ. Mmu 16--Comparative Genomic Highlights. Science Magazine 2002;296:1617-8.
7. Huang TH et al. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol 2003;95:300-7.
8. Bourrin S et al. Adverse effects of strenuous exercise: a densitometric and histomorphometric study in the rat. J Appl Physiol 1994;76:1999-2005.
9. Notomi T et al. Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. Eur J Appl Physiol 2000;82:268-74.
10. Singh R et al. Maintenance of bone mass and mechanical properties after short-term cessation of high impact exercise in rats. Int J Sports Med 2002;23:77-81.