

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO**

Tese

**O EFEITO DA CARGA COMPRESSIVA REPETITIVA SOBRE A
PLACA DE CRESCIMENTO**

Estudo experimental em ratos

Ivan Pacheco

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO**

**O EFEITO DA CARGA COMPRESSIVA REPETITIVA SOBRE A
PLACA DE CRESCIMENTO**

Estudo experimental em ratos

**Aluno: IVAN PACHECO
Orientador: Prof^a. Dr^a. FLAVIA MEYER**

*Tese submetida como requisito para a
obtenção do grau de Doutor ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências do Movimento
Humano da Escola de Educação Física da
UFRGS*

**PORTO ALEGRE
2003**

FICHA CATALOGRÁFICA

P116e

Pacheco, Ivan.

O efeito da carga compressiva repetitiva sobre a placa de crescimento: estudo experimental em ratos. / Ivan Pacheco. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 117 f., il., tab., graf..

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências do Movimento Humano. Escola de Educação Física. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1. Crescimento Ósseo. 2. Placa de Crescimento. 3. Esporte: crescimento. 4. Biomecânica. I. Título. II. Meyer, Flávia, orientador.

CDU: 796.012:612.753

“O HOMEM QUE NUNCA ERRA, NADA FAZ”

Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS:

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda preciosa de várias pessoas. Agradeço a todas, e, se por acaso, esqueço de citar uma delas, sei que estou cometendo uma grande injustiça, mas é involuntária.

Primeiramente, quero agradecer a minha orientadora Prof^a. Dr^a. FLAVIA MEYER que apostou na idéia deste trabalho. Sempre disponível, atenciosa, capaz, com democracia, entre outros tantos adjetivos. Um muito obrigado especial. Esta nova etapa da minha vida, esta conquista, só foi possível graças ao seu aval e à sua inestimável ajuda.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação da Escola de Educação Física da UFRGS. Todos eles foram muito atenciosos e sempre muito dispostos a colaborar com os alunos do programa.

À todos os funcionários do Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (CREAL), em especial à Sra. GENI FERNANDES DA SILVA, e Professor ERNANI DA ROSA CARMONA.

Ao funcionário do CREAL, MÁRCIO ARISTEU BARTOCHAK MAKEWITZ, que colaborou, inclusive nos finais de semana, para que os testes de impacto pudessem ser realizados.

À secretária do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas, FABIANA SILVA DA SILVA, pela cordialidade e atenção no atendimento.

Ao coordenador do Laboratório de Mecânica Aplicada da Escola de Engenharia da UFRGS, Prof. Dr. ALBERTO TAMAGNA que disponibilizou todos os meios possíveis para que as calibrações da máquina de impactos fossem realizadas.

Ao Engenheiro do Laboratório de Mecânica Aplicada da Escola de Engenharia da UFRGS e Mestrando em Engenharia, CARLOS ALBERTO THOMAS KERN, o PATO, sua colaboração foi decisiva. Não tinha momento ruim. Foi insistente e criterioso na calibração da máquina e sua ajuda foi preciosa.

Ao Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO GOLDIN, do comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, obrigado pelas orientações e parecer.

Ao coordenador do Laboratório de Pesquisa em Patologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas, Prof. Dr. CARLOS TADEU SCHMITT CERSKI que cordialmente acolheu este trabalho.

Ao Prof. Dr. LUIS FERNANDO DA ROSA RIVERO, patologista do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e professor da Faculdade de Medicina da UFRGS, outra pessoa que foi decisiva. Abdicou de momentos particulares para realizar as análises das lâminas. Sempre prestativo. O trabalho não teria sido possível sem a sua ajuda.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisas em Patologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas pela confecção das lâminas do estudo.

Aos meus colegas, aos estagiários do Centro de Medicina e Reabilitação do Esporte do Grêmio Náutico União e às secretárias BIANCA MOTA e CASSIANA. Mantiveram o trabalho de equipe para que eu pudesse realizar este sonho.

Finalmente à minha família e, especialmente, para ADRIANA MORÉ PACHECO e EDUARDA MORÉ PACHECO, que completam a minha vida com muito amor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tibia proximal e placa de crescimento.....	19
Figura 2 - As zonas da placa de crescimento.....	20
Figura 3 – As zonas e subzonas da placa de crescimento.....	20
Figura 4 – As lesões da placa de crescimento.....	36
Figura 5 – A máquina de impactos.....	47
Figura 6 – As partes da máquina de impactos.....	48
Figura 7 – Desenho esquemático da máquina de impactos.....	49
Figura 8 – Foto em detalhe da fixação do rato na máquina.....	50
Figura 9 – Foto da máquina ligado à célula de carga na calibragem.....	55
Figura 10 – Visão superior da calibragem da máquina.....	56
Figura 11 – O sinal comparativo com 3 porcas na calibragem.....	56
Figura 12 – A tibia direita do rato.....	60
Figura 13 – A tibia esquerda do rato.....	60
Figura 14 – Microfotografia da placa com aumento de 40X.....	62
Figura 15 – Microfotografia da placa com aumento de 100X.....	63
Figura 16 – Microfotografia da placa com aumento de 100X.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – O sinal de aquisição no SAD32.....	54
Gráfico 2 – Os dias de impacto e de coleta nos grupos.....	59
Gráfico 3 – Média e DP dos comprimentos das tíbias.....	66
Gráfico 4 – Média e DP das espessuras das placas de crescimentos.....	66
Gráfico 5 – Média e DP das espessuras das zonas de repouso.....	68
Gráfico 6 – Média e DP das espessuras das zonas proliferativas.....	68
Gráfico 7 – Média e DP do número médio de células nas zonas proliferativas.....	70
Gráfico 8 – Média e DP das espessuras das zonas hipertrófica e de calcificação...70	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostra da tomada do peso dos ratos	52
Tabela 2 – As faixas de calibrações das molas da máquina.....	52
Tabela 3 – Análise múltipla das médias dos comprimentos das tíbias.....	71
Tabela 4 – Análise múltipla da espessura da placa e zona de crescimento.....	72
Tabela 5 – Análise múltipla da espessura da zona proliferativa e número de células.....	72
Tabela 6 – Análise múltipla da espessura das zonas hipertrófica e de calcificação.....	73
Tabela 7 – ANEXO 1: Medidas no grupo 1.....	95
Tabela 8 – ANEXO 1: Medidas no grupo 2.....	96
Tabela 9 – ANEXO 1: Medidas no grupo 3.....	97
Tabela 10 – ANEXO 1: Medidas no grupo 4.....	98
Tabela 11 – ANEXO 1: Medidas no grupo 5.....	99
Tabela 12 – ANEXO 1: Medidas no grupo 6.....	100
Tabela 13 – ANEXO 2: MÉDIA, DP, valor de t e p do comprimento da tíbia e espessura da placa.....	101
Tabela 14 – ANEXO 2: MÉDIA, DP, valor de t e p da espessura da zona de repouso e proliferativa.....	102
Tabela 15 – ANEXO 2: MÉDIA, DP, valor de t e p do número de células na zona proliferativa e espessura das zonas hipertrófica e de calcificação.....	103

RESUMO

O Efeito do Impacto Repetitivo Sobre a Placa de Crescimento: Estudo experimental em ratos. Ivan Pacheco e Dra. Flávia Meyer. Palavras Chaves: Crescimento Ósseo, Placa de Crescimento, Impactos Repetitivos, Esporte e crescimento, Biomecânica.

Os impactos repetitivos decorrentes do esporte podem interferir no crescimento ósseo. Com o objetivo de tentar elucidar o efeito mecânico dos impactos repetitivos sobre a placa de crescimento ósseo, da tíbia proximal, um estudo experimental em ratos foi realizado. Inicialmente, foi desenvolvida uma máquina para a produção de impactos repetitivos na tíbia dos ratos. Os impactos repetitivos foram produzidos na tíbia direita em uma amostra de 60 ratos wistar, divididos em 6 grupos de 10 cada, sendo a esquerda o controle. A magnitude de impacto foi de aproximadamente 3,5 vezes a massa corporal dos ratos. Após os dias de impacto, os ratos foram sacrificados e as tíbias foram medidas. Em seguida um estudo histológico da placa de crescimento foi realizado. Foram medidas, a espessura total da placa de crescimento, a espessura da zona de repouso, de proliferação e hipertrófica e de calcificação juntas. Os resultados mostraram diferença significativa no comprimento da tíbia nos testes intra-grupos para os grupos 3, 4, e 5 ($p \leq 0,05$), e intergrupos para a tíbia direita e esquerda ($p \leq 0,05$).

A placa de crescimento mostrou uma menor espessura significativa na tíbia direita ($p \leq 0,05$). Na esquerda não houve alteração significativa da espessura da placa ($p = 0,109$). As zonas de repouso e proliferativa da placa da tíbia direita, e o número médio de células nas colunas da zona proliferativa apresentaram diferenças significativas intergrupos ($p = 0,013$, $p = 0,042$ e $p = 0,017$, respectivamente). As zonas hipertrófica e de calcificação apresentaram diferença significativas nas tíbias direita e esquerda ($p = 0,048$ e $p = 0,020$, respectivamente).

As análises múltiplas confirmaram que não existiram evidências de calcificação precoce da placa, com a magnitude de impacto produzida. Não houve mudança significativa nas zonas hipertrófica e de calcificação. A conclusão é de que os impactos repetitivos diminuem a espessura da placa de crescimento proximal da tíbia durante a puberdade, principalmente quando o tempo de impacto ultrapassa a metade do período de puberdade. Com a interrupção de 10 dias na produção dos

impactos, permaneceu a diminuição da espessura da placa proximal da tíbia. A cargas de impactos de aproximadamente 3,5 vezes a massa corporal não são suficientes para exibir evidências de calcificação precoce da placa de crescimento.

ABSTRACT

The effect of the Repetitives Impacts in Growth Plate: Experimental Study in Rats. Ivan Pacheco e Dra. Flávia Meyer. Key words: Bone growth, Growth plate, Repetitive impacts, Sports and growth, Biomechanics.

The repetitive impact in exercise could make an interference in bone growth. In last years, it could be seeing an increase in children participation in sports and leagues. With the objective to try to understand the mechanical effect of repetitive impacts at growth plate, at proximal tibia, an experiment was made.

Repetitive impacts was make at right tibia in a 60 wistar rats, with 6 groups with 10 rats each. The left tibia was the control. The magnitude of the impact was close to 3,5 of the corporal mass of the rats. After the impacts day, the animals was sacrifice and the tibias was measured. After that, an growth plate histological study was made. The total growth plate was measured, and also the resting zone, proliferative zone and hypertrophy and calcification together. Results shown a significative difference in tibia length in groups tests for groups 3,4 and 5 ($p \leq 0,05$).

The growth plate shows a significative small length at right tibia ($p \leq 0,05$). The left tibia did not shown any siginificative alteration in it length at growth plate. ($p=0,109$). The resting and proliferative zones, the number of the columns cellules of the proliferative zone, show a significative difference between groups ($p=0,013$; $p=0,042$ and $p=0,017$). The hypertrophic and calcification zones shown a significative difference between right and left tibia ($p=0,048$ and $p=0,020$).

The multiple analysis confirm that did not appear any evidence of precocious calcification, with that impact magnitude, even a reduce of total growth plate and proliferative zone.

SUMÁRIO:

1 - INTRODUÇÃO	16
2 - OBJETIVOS.....	19
2.1 - Objetivo Geral	19
2.2 - Objetivos Específicos	19
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 - O Esporte e as Lesões Músculo-Esqueléticas	20
3.2 - O Esporte e o Crescimento	21
3.3 - O Osso e a Placa de Crescimento	24
3.3.1 - O Osso.....	24
3.3.1.3 - O Crescimento Pós-Natal dos Ossos Longos.....	24
3.3.2 - A Placa de Crescimento	27
3.4 - A Biomecânica do Osso	34
3.5 - Mecanismo de Lesão na Placa de Crescimento	46
3.5.1 - A Fratura da Placa de Crescimento.....	48
3.6 - O Modelo Animal	51
3.6.1 - Anestesia em Animais de Experimentação	55
4 - HIPÓTESES.....	57
5 - MATERIAL E MÉTODOS	58
5.1 - Local de Origem e de Realização	58
5.2 - Delineamento	58
5.3 - Amostra	58
5.4 - Procedimentos	59
5.4.1 - A máquina de Carga Compressiva Repetitiva.....	60
5.4.2 - O Projeto Piloto para Teste da Máquina de Carga Compressiva.....	63
5.4.3 - Processo de Calibração da Máquina de Carga compressiva.....	64
5.4.4 - Determinação da Carga Compressiva.....	66
5.4.5 - Os Procedimentos de Coleta de Dados	70
5.4.6 - Preparação da Amostra e os Procedimentos do Estudo.....	70
5.5 – Análise Estatística	77
6 - RESULTADOS.....	78
6.1 – Análises comparativas entre a tíbia direita e esquerda nos seis grupos	78
6.2 – Análises de comparações múltiplas entre os seis grupos	84
7 - DISCUSSÃO	87
8 - CONCLUSÃO	93
9 – ESTUDOS FUTUROS.....	94

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
11 – ANEXOS 1 (TABELAS COM AS MEDIDAS EM MM DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS).....	108
12 - ANEXOS 2 (TABELAS COM AS MÉDIAS, DP E VALORES DE T E P DAS MEDIDAS ENTRE OS GRUPOS).....	114

1 - INTRODUÇÃO

A idéia de que os fatores mecânicos podem influenciar o crescimento parece ser aceita desde os tempos mais antigos, e as civilizações sempre deram atenção para as anormalidades do crescimento, da altura e do tamanho (Golding, 1994).

Avanços, clínicos e científicos, têm contribuído para o entendimento a respeito do desenvolvimento ósseo. Sabe-se, hoje, que, embora fatores genéticos possam ditar muitos parâmetros nas zonas de crescimento ósseo, os estresses mecânicos podem influenciar sua forma final. Na verdade, a forma, o tamanho e a seqüência do crescimento ósseo são geneticamente determinados, porém fatores ambientais (fenotípicos) influenciam na saúde (nutrição, cargas mecânicas) e durante períodos de doenças (traumas, infecções, medicações, radiação, etc). Por exemplo, as cargas mecânicas intermitentes, dentro de um limite fisiológico, parecem resultar em estímulo ao crescimento, ao passo que sobrecargas resultariam em redução do crescimento (Nap e Hazewinkel, 1994).

Nos últimos anos, também tem se observado um aumento no número de participações de crianças e adolescentes em competições esportivas e na prática de esportes. Este aumento pode levar a um maior número de lesões músculo-esquelético. Dentro deste aspecto, além das lesões agudas, as crônicas, secundárias às sobrecargas, são um dos problemas que podem ocorrer pela atividade física intensa. Por isso especula-se muito sobre qual a influência que os esforços repetitivos podem acarretar sobre a placa de crescimento dos ossos, principalmente com cargas submáximas e crônicas.

Maffulli e Bruns (2000) relatam que muitas lesões em crianças que praticam esportes são autolimitadas, sugerindo que o esporte em crianças é seguro e que o sistema esquelético delas mostra mudanças adaptativas ao treinamento intenso. Porém, durante o crescimento, existem mudanças significativas nas propriedades biomecânicas dos ossos e, neste período, o esporte pode resultar em danos aos mecanismos de desenvolvimento, com conseqüências para o resto da vida. Estes danos, na placa de crescimento, normalmente são devido às forças de cisalhamento ou avulsões, mas, as compressões também podem possuir um papel importante

neste região. Desta forma, é essencial que os programas de treinamento levem em consideração a imaturidade física e psicológica, para que os atletas possam adaptar-se às mudanças do seu organismo.

Mas, apesar dos avanços das pesquisas no campo do esporte e do desenvolvimento músculo-esquelético, muitas respostas a respeito da influência do exercício submáximo e dos impactos repetitivos sobre a placa de crescimento dos ossos ainda não estão esclarecidas. Com isso é preciso aos profissionais envolvidos com a prática de esportes, uma preocupação com as crianças que praticam estes esportes, monitorando as possíveis repercussões desta participação, e relacionando-as ao desenvolvimento e puberdade (Pigeon e col., 1997). Estas repercussões podem ser negativas e diminuiriam o crescimento ósseo, ou positivas, e, desta forma, estimulariam o crescimento ósseo.

Ainda, baseados na literatura, a respeito destas influências, pode-se ver que as forças atuantes sobre o esqueleto revelam uma taxa de resposta do crescimento longitudinal, provavelmente maior para a compressão do que para a tensão (Ogden e col., 1996). Lombardo e col. (1977) citaram um artigo de Ollier datado de 1867, onde já se fazia referências a este respeito e se dizia que a significância do encurtamento dos ossos após as lesões da placa de crescimento era devida ao retardo da proliferação da cartilagem desta placa, e que a ossificação tinha lugar precocemente em relação ao lado não afetado.

Com estes dados, Schnirring (2001) recomendou aos pesquisadores a busca das respostas sobre o efeito do exercício na idade óssea em relação à maturação sexual.

Pode-se observar, desta forma, que muitas dúvidas existem sobre a influência do exercício e do esporte sobre o desenvolvimento músculo-esquelético. E existem alguns problemas em se pesquisar estas variáveis em seres humanos. Desta forma, muitos modelos animais têm sido desenvolvidos e realizados pela literatura, a fim de pesquisar os efeitos do esporte, dos impactos e forças atuantes sobre os ossos. Como se deve procurar uma fidelidade dos dados, e esta fidelidade muitas vezes necessita estudos invasivos, os desenhos com estudos de laboratório são utilizados. Também se podem controlar muitas variáveis como temperatura, alimentação, etc. De encontro a esta idéia, Raymundo e Goldim (2000) referem que o uso de animais é necessário para o avanço no conhecimento da área da saúde do homem. O objetivo maior destes modelos é que os dados obtidos nestes

experimentos possam ser inferidos ao ser humano (Aerssens e col., 1998). Neste campo, o modelo com ratos é largamente utilizado em pesquisas sobre as respostas ósseas às forças atuantes sobre ele, embora, alguns autores relatem algumas diferenças estruturais com os ossos dos humanos (Aerssens e col., 1998). Outros observam que a estrutura óssea, cartilagem articular, inserções capsulares e a muscular do rato, são semelhantes aos do homem. As semelhanças estruturais e histológicas seriam evidentes entre roedores e os seres humanos o que faria com que os dados possam ser inferidos ao homem (Carlstedt e Nordin, 1989; Bagi e col., 1996)

Diante de muitas dúvidas em relação aos efeitos do exercício e esporte sobre a placa de crescimento, esta tese se constituiu em um estudo que onde foram produzidas cargas compressivas repetitivas (impactos repetitivos) em um dos membros inferiores de ratos, iniciando na fase pré-púbere para análise da placa de crescimento.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Analisar se há alteração no crescimento longitudinal normal da tíbia de ratos pré-púberes e púberes, após carga compressiva repetitiva padronizada.

2.2 - Objetivos Específicos

a) Tentar elucidar o papel da carga compressiva repetitiva (impactos repetitivos) na ossificação endocondral, na morfologia e nos condrócitos da placa de crescimento dos ossos longos;

b) Avaliar se existe alteração no comprimento ósseo dos ossos longos após esta carga compressiva repetitiva (impacto repetitivo).

c) Analisar as alterações (velocidade de crescimento e celularidade) da placa de crescimento através de estudo histológico produzidas pela carga compressiva repetitiva.

Os objetivos específicos do presente estudo baseiam-se na realização de um teste experimental com animais, com a produção de carga compressiva repetitiva sobre o joelho de um dos membros inferiores de ratos pré-púberes e púberes, e conseqüente medição do comprimento ósseo e estudo histológico da placa de crescimento desta região, comparando com o membro contralateral para verificar se ocorreram alterações nesta região óssea. Foi escolhida a articulação do joelho por ser ela a região responsável pela maior porcentagem de crescimento nos membros inferiores (Ogden, 1990); e, das duas placas de crescimento próximas ao joelho, foi utilizada a da tíbia. Ainda, a placa proximal da tíbia, oferece fácil acesso e, segundo Rodriguez e col. (1992) é um osso que possui muitos estudos no campo da biomecânica devido a estes fatores.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - O Esporte e as Lesões Músculo-Esqueléticas

Nos últimos 20 anos, observou-se um aumento na participação de crianças em esportes competitivos (Mansfield e Emans, 1993). E especula-se que em uma criança em desenvolvimento, forças excessivas aplicadas nos ossos podem resultar em danos à placa de crescimento (Malina, 1969; Mansfield e Emans, 1993). A literatura mostra muitas pesquisas neste campo. Pigeon e col., (1997), em um estudo longitudinal de cinco anos, avaliaram um grupo de 97 dançarinas para definir o efeito do treinamento esportivo intenso no crescimento e na maturação. Os autores acham que o acompanhamento de atletas deve considerar os fatores que podem levar a desordens endocrinológicas, nutricionais e psicológicas também pois estes fatores podem contribuir para os distúrbios do desenvolvimento.

Também Buckler e Brodie (1977) observaram que meninos ginastas são menores do que meninos que não são ginastas. O exercício poderia exercer o papel de trauma crônico nas regiões de crescimento ósseo. Estes traumas crônicos foram objeto de estudo de Lombardo e col., (1977). Eles mostraram que discrepâncias dos membros inferiores podem ser decorrentes das fraturas nas placas de crescimentos e os traumas repetitivos e crônicos poderiam desempenhar um papel para que esta discrepância acontecesse.

Outros autores têm analisado a incidência de lesões na placa de crescimento de crianças (Hastings e col., 1984, Mizuta e col., 1987, Neer e Horwitz, 1965, Peterson e Peterson, 1972). Alguns mostram que aproximadamente 15% a 20% das lesões em ossos longos das crianças envolve a placa de crescimento (Hastings e col., 1984, Light e Ogden, 1987, Torre, 1988) e o pico de incidência destas lesões ocorre durante o período de crescimento rápido no início da puberdade, aproximadamente aos 11 anos nas meninas, e aos 12 ou 13 anos nos meninos (Peterson e Peterson, 1972). Especula-se que o esporte cause estas lesões nesta região dos ossos e elas ocorreriam principalmente próximo ao joelho e tornozelo (Ertl e col., 1988, Lombardo e Harvey, 1977, Torg e col., 1981).

Também estudos radiográficos (Albanese, e col, 1989) mostram mudanças na placa de crescimento distal do rádio, consistentes com lesões por sobrecarga. A taxa varia de 8% a 85% em ginastas jovens de elite. Por exemplo, o desenvolvimento de uma variação ulnar positiva (crescimento da ulna além do limite do comprimento do rádio) tem sido considerada como um resultado de uma inibição de crescimento distal do rádio devido ao impacto repetitivo crônico na placa. DiFiori e col., (1997) estudaram uma população de ginastas esqueleticamente imaturos, não de elite. Eles não encontraram relação entre a variação ulnar e os achados radiográficos, mas mostraram uma variação ulnar semelhante tanto nos atletas de elite como não elite. Ainda, Di Fiori, e Mandelbaum (1997), estudaram as evidências de lesão nas placas de crescimento no punho de ginastas com imaturidade óssea através de RX e ressonância nuclear magnética (RNM). O RX mostrou evidências de pontes calcificadas através da placa, e a RNM mostrou evidências de isquemia na epífise e na metáfise, devido ao estresse repetitivo.

Beunen e col. (1999) também estudaram a variação ulnar positiva no punho de ginastas. Os autores acham que o crescimento ulnar, apenas, parece não estar relacionado com a maturidade óssea do rádio, e aparentemente não estava relacionado à fusão precoce da placa de crescimento distal deste osso.

3.2 - O Esporte e o Crescimento

O crescimento normal tem sido estabelecido na literatura, e existem, padrões de curvas para que se possa acompanhar a normalidade desde o nascimento até a puberdade (Marques, 1982). Porém, em praticantes de exercícios intensos e de esportes de alto rendimento, nem sempre se consegue identificar este padrão de curva na maturação e no crescimento, e isto tem intrigado pesquisadores e profissionais da saúde.

Tanto observações clínicas como trabalhos experimentais em animais têm sido realizados a fim de tentar definir as implicações do exercício no desenvolvimento esquelético. Estas observações são, na maioria, em ginastas.

Jost-Relyveld e Sempé (1982) já relatavam a associação entre a idade

óssea retardada em relação à cronológica, e a prática de ginástica e outras investigações clínicas mostram que ginastas possuem menarca atrasada ou irregular, e o alto gasto energético pode explicar, em parte, o percentual baixo de gordura, o atraso puberal e os padrões menstruais (Lindholm e col., 1995).

Weimann e col (1998) citaram que o treinamento intensivo em ginastas de elite, combinado com ingesta nutricional inadequada, afeta significativamente a puberdade. Estes efeitos não são vistos em ginastas masculinos devido ao regime diferente de treinamento comparado com as ginastas. Schwidergall e col (1998) acharam resultados semelhantes a também observaram que as meninas ginastas apresentavam tendência a um comportamento alimentar mais patológico.

Mas, o treinamento intensivo isoladamente, talvez tenha pouca influência na altura adulta que um atleta terá quando adulto. Tanner e Whitehouse (1976) disseram que, em crianças normais, a altura final na idade adulta é praticamente independente da precocidade ou retardo da maturação. Ao encontro desta idéia, estão os achados de Theinz e col. (1993). Eles avaliaram prospectivamente 22 ginastas e 21 nadadoras, comparando-os com um grupo de 43 adolescentes. A velocidade do crescimento foi significativamente menor nas ginastas, dos 11 a 13 anos. Os autores concluíram que o treinamento intensivo possui pouco efeito na altura final da idade adulta, pois viram que as ginastas, apesar da diminuição na velocidade de crescimento, exibiram uma compensação no crescimento estatural após a parada com os treinamentos. Eles sugerem que as ginastas possuem um padrão de altura familiar baixa. Mansfield e Emans (1993), acham que o esporte por si só pode ser seletivo.

Também, a diminuição da velocidade de crescimento pode ser influenciada pelo atraso puberal e pela restrição alimentar que caracteriza este esporte. Quando medida a altura em pé e sentada, para determinar se a baixa estatura era produzida no tronco ou membros inferiores, viu-se que o comprimento dos membros inferiores tinha uma redução durante a puberdade. Isto pode ser devido a acelerações e a desacelerações verticais repetitivas. Com a interrupção destas “agressões”, existiria uma compensação no crescimento e a altura final não seria influenciada por este esporte. Porém, os autores advertem que treinamentos acima de 18 horas semanais podem afetar definitivamente o crescimento.

Lindholm e col (1994) estudaram o desenvolvimento puberal em 28 ginastas de elite que iniciaram a participação no esporte entre 7 e 8 anos, e que

treinavam de 10 a 20 horas por semana. O estudo sugeriu um efeito inibitório do treinamento físico intenso no crescimento.

Pigeon e col., (1997) encontraram um estado maturacional atrasado em dançarinas de balé. Eles realizaram um estudo longitudinal para determinar o efeito do treinamento intensivo no crescimento e puberdade. Os autores não encontraram evidências clínicas de danos às estruturas ósteo-articulares e os efeitos da dança no estado maturacional atrasado encontrado, podem ter sido influenciados pela nutrição uma vez que as dançarinas tinham ingestão baixa de calorias e de micronutrientes.

Georgopoulos e col., (1999) avaliaram 255 ginastas (GRD) com idade média de 13 anos e encontraram uma maturação esquelética atrasada neste grupo. Mas, mesmo com o estirão do crescimento sendo observado tardiamente, existe uma recuperação do potencial de crescimento após o abandono da prática deste esporte. Outra observação dos autores foi a de que lesões por sobrecarga ou sobreuso na placa de crescimento, especialmente nos membros inferiores, podem ter um efeito adicional nestes resultados inibitórios.

Bass e col., (2000) tentaram definir se a baixa estatura, o atraso puberal e o retardo da idade óssea estão ligados à prática da ginástica e ao treinamento. Estes autores acham que a baixa estatura é devida em parte à seleção dos indivíduos. O déficit da altura é reversível com a parada da prática da ginástica.

Damsgaard e col., (2000) compararam o crescimento em atletas de 4 modalidades esportivas a fim de determinar se o esporte afeta negativamente o crescimento pré-puberal. Eles analisaram 184 atletas de 9 a 13 anos, de ambos os sexos, na natação, no tênis, no handebol e na ginástica. Os autores perceberam uma diferença significativa nas horas de treinamento entre os esportes. Um dos achados mais notados foi o de que as nadadoras eram significativamente mais altas do que as ginastas, e os ginastas, no geral, eram menores em estatura e IMC do que os atletas dos outros esportes. Porém, os autores falharam em mostrar uma influência significativa entre o tipo de esporte e o número de horas de treinamento na altura final alcançada. Os autores acham, com isto, que os fatores como os genéticos, a altura no início da prática do esporte, e o estado puberal, são importantes na determinação da altura final na idade adulta, e são importantes na escolha do esporte. O esporte seria um dos fatores seletivos e, desta forma, ginastas com estaturas altas não teriam boas performances.

3.3 - O Osso e a Placa de Crescimento

3.3.1 - O Osso

Anatomicamente, os ossos longos são compostos de uma diáfise (porção central), de duas epífises (extremidades) e de uma zona entre cada epífise e a diáfise, chamada de metáfise. Entre a metáfise e a epífise, existe no esqueleto em crescimento, uma zona cartilaginosa chamada de placa de crescimento ou epifisária.

A forma e a estrutura deste órgão são influenciadas por fatores genéticos e por ambientes mecânicos a que ele é submetido (Tseng e Goldstein, 1998; Hsieh Y-F e col., 1999; Frost e Schönau, 2001).

3.3.1.3 - O Crescimento Pós-Natal dos Ossos Longos

Dois processos separados, anatômicos e funcionais, estão envolvidos no crescimento longitudinal dos ossos longos: um é localizado na placa de crescimento, e o outro no osso recém formado na metáfise (modelação e remodelação da metáfise). Na placa de crescimento, os fenômenos básicos podem ser divididos em diferenciação dos condrócitos, proliferação, hipertrofia e mineralização da matriz (Nap e Hazewinkel, 1994).

A placa de crescimento tem sido caracterizada pela sua morfologia e pela função única no esqueleto (Vanky e col., 2000; Robertson, 1990). Morfologicamente, ela é uma camada de cartilagem hialina especializada, com a função de providenciar o crescimento longitudinal dos ossos através da ossificação endocondral, possibilitando, com isso, o crescimento do osso até que a estatura adulta seja atingida, quando é completamente substituída por osso.. (Bashey e col., 1991).

Na placa de crescimento, os condrócitos seguem um padrão predeterminado de diferenciação. Muitas hipóteses têm sido formuladas para explicar como a diferenciação e a mineralização da cartilagem é regulada, e também

os mecanismos da maturação dos condrócitos. Para alguns autores, estas hipóteses permanecem ainda sem uma explicação definitiva. (Vanky e col., 2000).

Com o propósito de esclarecer as dúvidas sobre as regulações e de como os fenômenos de diferenciação e mineralização acontecem, muitos estudos com modelos animais têm sido utilizados. Por exemplo, alguns deles têm demonstrado que o GH estimula a proliferação de condrócitos e também que ele pode enfraquecer a placa de crescimento. (Watkins, 1996). A proliferação e a maturação dos condrócitos parecem ser reguladas também por algumas proteínas, por exemplo, a proteína paratireóide- relacionada (PTHrP) (Byers e col., 2000). Ainda, Vanky e col. (2000) referem que fatores hormonais podem atuar na velocidade de proliferação celular na placa. O estrogênio, por exemplo, seria crítico para a fusão da placa tanto no homem jovem quanto na mulher jovem. (Öz e col., 2001)

Observa-se, desta forma, que as células da placa de crescimento possuem seu metabolismo fortemente influenciado pelo sistema hormonal, (Dechiara e col., 2000).

Apesar desta influência ser importante, outros fatores podem exercer influência sobre a placa. Rodriguez e Rosselot (2001), por exemplo, observaram que o zinco estimula a proliferação de condrócitos da zona de proliferação de 40% a 50%.

Independentemente de qual dos fatores está atuando, até o final do crescimento, os ossos longos continuam a desenvolver-se como resultado do crescimento da cartilagem da placa de crescimento, causando o aumento do comprimento do osso (Young-In e col.,1998, Felisbino e Carvalho, 1999, Vanky e col., 2000; Byers e col., 2000;). E a atividade das células na placa de crescimento influencia diretamente o crescimento dos ossos longos. Isto é particularmente verdadeiro para os mamíferos e aves. Na verdade, a proliferação celular, a produção de matriz e a hipertrofia dos condrócitos são os três fatores que estão mais associados às atividades da placa de crescimento (Felisbino e Carvalho, 1999).

Mas, interessante, a produção de nova matriz cartilaginosa não aumenta a espessura da placa, porque a formação da cartilagem dentro dela só é suficiente para acompanhar sua reposição pelo tecido ósseo no lado da diáfise. Como as placas de crescimento crescem em um lado, e são substituídas por osso no outro, elas afastam-se gradualmente, aumentando a diáfise óssea que se localiza entre elas. A reposição óssea alcança a produção de cartilagem, quando o osso

atinge o seu tamanho adulto e suas placas cartilaginosas epifisárias desaparecem. (Ham, 1991).

Byers e col. (2000) observaram que a altura das zonas hipertrófica e proliferativa diminuem com a idade, principalmente no primeiro ano de vida após o nascimento. A matriz cartilaginosa aumenta em cada zona com a idade com um concomitante aumento na espessura dos septos de cartilagem e osso do trabecular (esponjoso) adjacentes à placa.

Embora o conhecimento sobre a placa tenha aumentado, ultimamente, não se conhece, ainda como se inicia o processo de sua calcificação e a conseqüente finalização do crescimento. Por exemplo, as vesículas da matriz parecem interagir com algumas proteínas da matriz da placa de crescimento. A interação pode exibir altos níveis de fosfatase alcalina e outras atividades enzimáticas, e um influxo de cálcio. Estes fenômenos podem ser os fatores iniciais deste processo (Wu e col., 1991, Wuthier e col., 1992). Isto pode explicar parcialmente os sítios focais de calcificação inicial na região da placa

Por outro lado, o crescimento ósseo sofre influência principalmente mecânica nos membros inferiores, como se vê no desenvolvimento da tíbia. Um encurvamento fisiológico em varo é observado após o nascimento e no início da deambulação. Com o crescimento, este encurvamento progressivamente torna-se valgo. Após este fenômeno, a tíbia volta para um alinhamento neutro, ao redor dos 5 anos de vida. O apoio, na marcha, aplica forças verticais que influenciam este encurvamento. Estes fenômenos são resultados da compressão e da tensão na placa de crescimento (MacMahon e col., 1995).

Apesar do efeito das forças mecânicas na placa de crescimento, existe um fator intrínseco que controla o crescimento que é o perióstio. Ele está aderido diretamente a uma zona chamada de Ranvier, em cada lado do osso em desenvolvimento, porém com menor intensidade na diáfise e metáfise. Ressecções experimentais de parte do perióstio causam uma aceleração do crescimento longitudinal. O estímulo ao crescimento causado pelas forças de reação das articulações, parece ser suavizado pela restrição tênsil intrínseca imposta pela camada cilíndrica do perióstio que contorna a placa. Quando ele é temporariamente liberado em uma fratura, um aumento do crescimento pode ocorrer. A densa inserção periférica do perióstio aumenta a resistência ao redor da placa de crescimento às forças tenses e de cisalhamento. O perióstio também se liga ao

pericôndrio da epífise e do complexo cápsulo-ligamentar das articulações, aumentando ainda mais a sua resistência. Em contrapartida, o periósteo é aderido relativamente frouxo à metáfise óssea, e na diáfise mais frouxo ainda do que nas regiões anteriores. Desta forma, parece que ele exerce um papel mecânico importante na proteção da placa de crescimento às fraturas. Porém, ele não confere estabilidade a uma fratura se ele for completamente rompido, e como é extremamente osteogênico, leva a uma rápida formação óssea subperiosteal. O periósteo deve ser considerado como um estabilizador na placa, uma vez ocorrida uma falha da mesma. Ele pode prevenir um grande deslocamento se as forças atuantes não são suficientes para romper suas fibras; porém, as suas propriedades tênsis provavelmente não são exigidas antes da falha completa da cartilagem. Este conceito vem de encontro a achados clínicos aonde algumas lesões da placa ocorrem sem evidências radiográficas de deslocamento da região, como em algumas fraturas por compressão (Ogden e col., 1996).

Em uma visão microscópica, existem pequenas irregularidades ao longo da junção da placa com a metáfise óssea conhecidas como processos mamilares. É hipoteticamente aceito que estas interdigitações auxiliam no aumento da resistência da placa às forças de distração, contribuindo para aumentar a resistência da placa durante a puberdade (Chung e col., 1976).

A estrutura das placas cartilaginosas epifisárias é descrita na seção seguinte.

3.3.2 - A Placa de Crescimento

Uma placa epifisária, quando observada em corte longitudinal, apresenta uma aparência bastante característica. A zona central da placa, por exemplo, possui colunas de células paralelas ao eixo longitudinal do osso, uma junção condro-óssea reta, e uma formação trabecular regular. As zonas periféricas possuem uma orientação colunar oblíqua em direção à superfície externa do osso e côncava na junção osso-cartilagem (Rodriguez e col., 1992).

A placa mostra uma mudança histológica com a idade. Lippiello e col. (1989), ao estudarem a sua geometria no fêmur distal de cães, observaram que a

placa, no período do nascimento, permanece relativamente chata até que a ossificação da epífise tenha início com 1 semana de idade. Com 10 semanas, uma taxa uniforme de proliferação celular foi observada coincidindo com a completa ossificação da epífise. Estes dados sugerem que variações localizadas na proliferação celular da placa de crescimento são associadas com a ossificação da epífise. Antes da segunda metade do desenvolvimento fetal, ela é mais celular, possui pouca organização e pouco desenvolvimento de matriz (Rodriguez e col., 1992).

Autores como Bashey e col. (1991.), Byers e col. (1997), Weise e col. (2001) e Abad e col. (2002) dizem que, a placa de crescimento pode ser dividida em 3 zonas baseadas na morfologia e nas características funcionais; *a zona de repouso, a proliferativa e a hipertrófica*. Para Byers e col. (1997) mudanças contínuas na forma, no tamanho e no volume da matriz são observados nestas zonas conforme os condrócitos progridem durante o seu ciclo de vida. Também critérios morfológicos foram usados para definir as zonas hipertróficas e proliferativas na placa de crescimento e do osso esponjoso primário na metáfise (Byers e col., 2000). Com a progressão dos condrócitos da zona proliferativa para a zona hipertrófica, os condrócitos exibem mudanças morfológicas profundas, que são acompanhadas por uma mudança drástica na sua biossíntese (Bashey e col., 1991). Autores como Rodriguez e col. (1992), em estudo histológico da placa de crescimento humano em cadáveres de fetos e recém-nascidos, não incluíram a zona de repouso, pois dizem que esta zona não possui critérios morfológicos precisos para distingui-la da cartilagem da epífise óssea, e porque ela representa, morfológicamente, uma parte muito pequena da placa. Outros descrevem 4 zonas básicas como Nap e Hazewinkel (1994), e mais, alguns adicionam outras zonas entre elas.

A seguir, estão descritas as 4 zonas mais conhecidas na literatura, que são, da epífise para a diáfise, denominadas de zonas (1) *de cartilagem em repouso*, (2) *cartilagem proliferativa*, (3) *cartilagem em maturação*, (4) *cartilagem em calcificação*. Estendendo-se da quarta zona para a diáfise, há remanescentes de cartilagem calcificada com uma fina camada de matriz óssea nas suas superfícies chamada de esponjosa (figuras 1 e 2).

1. **Zona de cartilagem em repouso.** Esta zona é a mais próxima da epífise, sendo denominada em repouso porque seus condrócitos não contribuem ativamente para o crescimento ósseo. No início é relativamente longa e cresce em todas as direções (Leeson, 1970). Secções histológicas revelam que as células estão dispostas randomicamente na matriz, e a taxa entre o volume desta matriz para o volume celular é a maior da placa inteira. A matriz contém fibrilas de colágeno tipo II que inibem a calcificação e agem como uma barreira contra o avanço do centro secundário de ossificação (Robertson, 1990). Há presença de capilares entre elas e a epífise adjacente. Esses vasos são importantes porque, além de fornecerem nutrientes e oxigênio para a epífise, eles nutrem os condrócitos na placa epifisária abaixo até sua zona de cartilagem em calcificação. A principal função desta zona é fixar as outras zonas da placa epifisária à epífise (Ham, 1991; Leeson e Leeson, 1970). Porém, Abad e col. (2002) levanta 3 hipóteses para explicar a função desta zona; 1: ela contém células tronco capazes de gerar novos clones de condrócitos para a zona proliferativa. 2: Ela produz substâncias que direcionam o alinhamento das células na zona hipertrófica e colunas paralelas ao eixo dos ossos longos. 3: Produz fatores que inibem a diferenciação hipertrófica das suas células, organizando, desta forma, a diferenciação entre a zona de repouso e a hipertrófica.

2. **Zona de cartilagem proliferativa.** Os condrócitos são firmemente ligados em colunas paralelas dispostas ao longo do eixo axial do osso. A matriz possui as mesmas características bioquímicas que a zona anterior (repouso) e o colágeno é orientado longitudinalmente rodeando as colunas (Robertson, 1990). Inicia no topo das colunas dos condrócitos e estende-se até o ponto onde as células dobram de volume, indicando o início da zona hipertrófica. Byers e col. (2000), estudando a placa da junção costochondral, observaram que esta zona diminui significativamente a sua altura com o avanço da idade. O volume da cartilagem na zona proliferativa aumenta significativamente com a idade de 60%, aos 11 dias, para 77% com um ano de vida, e 82% aos 13 anos. Os condrócitos da placa dividem-se somente nesta região sendo numerosas as mitoses (Robertson, 1990) e, além disto, estes condrócitos possuem tamanho constante. (Byers e col., 1997.). Como eles

estão dispostos em colunas e são achatados, dão um aspecto de “pilhas de moedas” à zona (Ham, 1990). Este achatamento pode ser consequência da alta taxa de mitose da zona (Robertson, 1990) e parece que a orientação espacial dos condrócitos direciona o crescimento e por isto é responsável pelo alongamento ósseo assumido pelo crescimento, endocondral. O mecanismo pelo qual os condrócitos proliferativos reconhecem a linha de crescimento ao longo do eixo axial dos ossos longos ainda é desconhecido (Abad e col., 2002).

O crescimento da placa depende muito da capacidade de multiplicação nesta zona (Chung e col., 1976). As colunas crescem principalmente por adição de células no seu extremo distal à diáfise (Leeson e Leeson, 1970; Ham 1991). As células desta zona elaboram uma matriz extracelular característica da cartilagem hialina. Ela contém predominantemente colágeno tipo II junto com proteoglicanas que se agregam com o ácido hialurônico. Em estudos com mamíferos como os bovinos, por exemplo, a concentração de agregados de proteoglicanas alcança um máximo na matriz extracelular nesta zona no momento que a calcificação inicia. Neste momento, o volume extracelular diminui significativamente. A importância clínica desta observação é a de que as proteoglicanas podem agir como sítios de nucleação da calcificação da placa (Matsui e col., 1991). O controle hormonal nesta zona é intenso. Por exemplo, o hormônio do crescimento e o paratormônio possuem sua maior atividade na porção mais alta desta zona. Também, fatores locais, como a compressão, podem ser ativos na regulação do crescimento longitudinal desta zona. Mudanças na concentração de pO_2 afetam esta região, e taxas de atividade metabólica aeróbica resultam em alterações nos estoques de glicogênio das suas células (Robertson, 1990). Estes fatores provavelmente tornam esta zona sensível aos efeitos da atividade física.

3. **Zona Hipertrófica.** Também conhecida como zona de maturação. Consiste da região que inicia abaixo da zona de proliferação até os últimos septos transversos intactos de cartilagem. Byers e col. (2000) observaram que esta zona também diminui a sua altura com a idade, e o decréscimo é maior no primeiro ano de vida, assim como a zona proliferativa. Segundo estes autores, o volume da cartilagem, nesta zona, aumenta com a idade; de 25% da espessura total da placa, com 11 dias, para 40% com um ano de vida, e permanece com este índice a partir daí (Byers e col., 2000). Não apresenta mitoses (Leeson e Leeson, 1970) e os

condrócitos ainda são dispostos em colunas longitudinais, mas sofrem hipertrofia, acúmulo de glicogênio e lipídeos. Apresenta ambiente anaeróbico, e talvez por causa disto, o ATP não é formado em quantidade suficiente nas mitocôndrias e ela exibe uma significativa concentração de cálcio no interior das células. Conforme a energia é depletada, esta concentração de cálcio não pode ser mantida, e ele é liberado na matriz, contribuindo para o início da calcificação da placa (Robertson, 1990). Os condrócitos desta zona produzem grande quantidade de fosfatase alcalina, uma enzima que poderia facilitar a calcificação da matriz extracelular (Ham, 1991).

As alterações na composição de proteínas e elementos estruturais na matriz desta zona parecem ocorrer no processo de calcificação. Vesículas na matriz, derivadas dos condrócitos aparecem nesta região e podem ser os sítios iniciais da calcificação. Por outro lado, capilares da metáfise vão invadindo e os condrócitos vão sendo removidos. (Byers e col., 1997; Wuthier e col., 1992.).

Progressivamente, as células vão diminuindo o seu metabolismo até sofrerem um processo de ossificação (Chung e col., 1976). Nos mamíferos, o crescimento longitudinal dos ossos poderia ser muito dependente da hipertrofia dos condrócitos desta zona (Felisbino e Carvalho, 1999). Algumas técnicas têm mostrado que a porção mais baixa desta zona possui condrócitos vivos e ativos ao invés de apenas degenerativos (Robertson, 1990).

4. **Zona de calcificação.** Os condrócitos aumentam a degeneração e a matriz apresenta grande deposição de minerais (Leeson e Leeson, 1970, Roos, 1993). Ham (1991) cita um trabalho de Hunzikerr e col., onde comenta sobre a necessidade de reavaliar a hipótese da degeneração dos condrócitos nesta zona. Métodos com congelamento rápido e alta pressão, seguidos de congelamento por metanol, mostram que muitos condrócitos nesta zona ainda estão inteiros.

A quantidade de cartilagem nova produzida na zona proliferativa é igual à quantidade reabsorvida na zona de reabsorção, e, portanto, a espessura da placa permanece razoavelmente constante (Roos, 1993). Desta forma, assim que a nova cartilagem produzida na placa epifisária sofre calcificação, é substituída por osso. A conseqüente reposição progressiva da cartilagem que calcifica na face diafisária de ambas as placas de crescimento aumenta pouco a pouco o comprimento da diáfise óssea.

A figura 1 mostra a localização da placa de crescimento na tíbia proximal, já a figura 2 mostra esta placa com as diferentes zonas separadas por cores, onde pode-se ver as diferentes formas celulares de cada uma. Em seguida, a figura 3, mostra com maior detalhes, a divisões de cada zona.

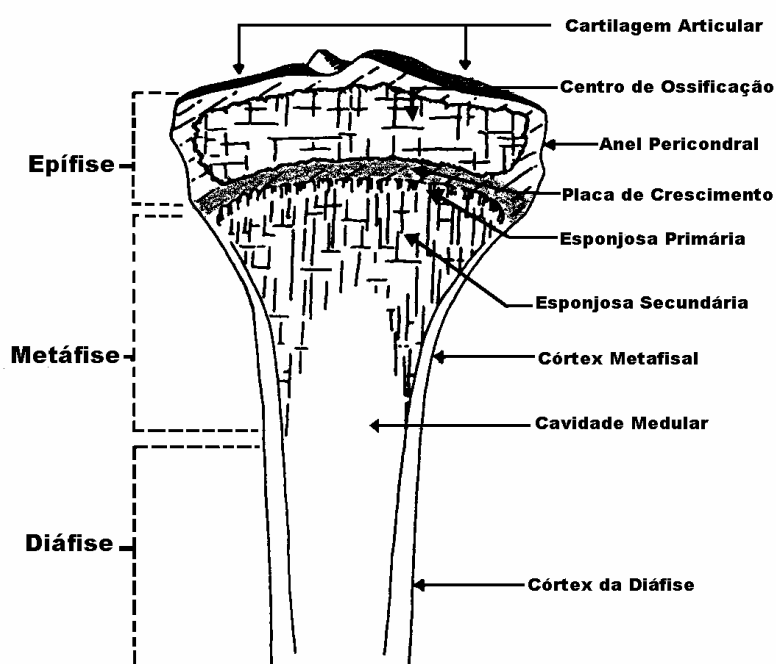


Figura 1: Tíbia proximal de uma criança usada como exemplo. Este desenho ilustra a terminologia utilizada no texto.



Figura 2: A placa de crescimento do osso mostrando o arranjo das diferentes camadas de células, à esquerda, e a região correspondente no osso, à direita. (adaptada de Ham: Histologia (capítulo 12, O Osso); 9ª edição, 1991 e Roos, Mitchel: Histologia, texto e Atlas (capítulo 8, Osso), 2ª edição, 1993).

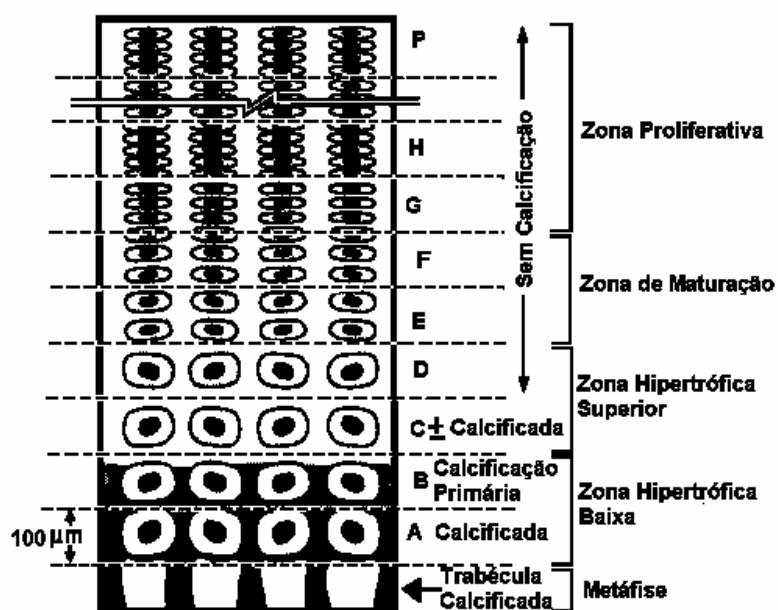


Figura 3: Desenho mostrando em detalhes as zonas da placa de crescimento, inclusive subzonas (Matsui e col. (1991)).

3.4 - A Biomecânica do Osso

Em 1900 existia um conceito de que os osteoblastos formavam osso e os osteoclastos o reabsorviam. Isto sugeria que, independentemente de um controle, estas células determinavam a resistência e a saúde do osso. Pensava-se que as desordens ósseas dependiam muito destas células e do seu controle por agentes não mecânicos. Os mecanismos biomecânicos eram desconhecidos e não se acreditava terem um papel na resistência e na saúde óssea. Nesta época, esta idéia era um dogma e um paradigma. Porém, a partir dos estudos realizados no laboratório do professor Jee na Universidade de Utah com animais vivos, novos pensamentos foram incorporados na compreensão da fisiologia ósteo-muscular. Criou-se o paradigma de Utah. O novo paradigma estendeu as aplicações para funções das articulações, ligamentos, tendões e fascias (Frost e Schönau, 2001).

Estes estudos mostraram que a interação mecânica entre a ação muscular e a formação óssea é muito estreita. Viu-se que a resistência do osso depende de propriedades comuns a muitos materiais como a quantidade de osso na área transversal (fator massa), tamanho, forma e localização do tecido no espaço (fator arquitetura) e de que ele é afetado pela fadiga dos materiais (fator de microdanos). As pesquisas mostram que forças repetitivas causam fadiga ou microlesões ósseas que enfraquecem o osso. A remodelação fisiológica pode reparar estes eventos com a formação de osso novo. Porém, se a agressão for maior do que o limite da reposição, os danos vão se acumulando e causam estresse ou fraturas no osso. Ainda podem enfraquecer o osso, e forças de baixa energia podem causar fraturas (Frost e Schönau, 2000). Yeni e Fyhrie (2002) também compactam desta idéia, ao mostrarem que cargas que provocam fadiga no osso acumulam microdanos que levam a fraturas macroscópicas e falha total do osso.

Então, enquanto a forma individual dos ossos é geneticamente controlada, a organização local da geometria e da arquitetura é dependente das forças aplicadas nestes locais (Vico e col., 1999). Neste sentido, a interação entre os tecidos em desenvolvimento é um dos fatores mais importantes na regulação da expressão dos genes, no metabolismo celular e na síntese de matriz durante a embriogênese,

Desta forma, fatores mecânicos terão papel mesmo em ossos que não suportarão o peso corporal. O estresse intermitente imposto no tecido esquelético,

deformações, e movimentos causados pela contração muscular, começam a ter um papel importante na modulação da cartilagem de crescimento e nas taxas de ossificação. Estas cargas mecânicas possuem um papel crítico na regulação da esqueletogênese do feto, no útero. As inibições da contração muscular e dos movimentos causam severas anormalidades no desenvolvimento ósseo. Após o nascimento, o crescimento e a ossificação continuam sob forte influência da atividade física e das forças externas aplicadas (Golding, 1994).

Assim, vê-se que sob influência da função, a estrutura óssea é reestruturada. E esta também é a base da lei de Wolff. O osso responde na sua estrutura a diferentes forças como a compressão, tensão e torção (Golding 1994). Porém, a adaptação funcional ainda não está bem esclarecida. Até o presente, o esquema geral do mecanismo de adaptação é de que o osso responde às forças internas com aposição óssea, enquanto que a inatividade resulta em reabsorção. Parece que o ponto inicial da reação são cargas intermitentes, aonde pressão e tensão produzem o mesmo efeito. Em relação à placa de crescimento dos ossos, é observado em determinados momentos que a sobrecarga reduz o crescimento. Por outro lado, nas cargas oblíquas sobre a placa, por exemplo, devido à assimetria das forças, o crescimento é na direção da pressão. Na verdade, não existe um algoritmo uniforme da função de adaptação do osso e dois mecanismos parecem estar envolvidos: 1, modelação da superfície do osso pelo perióstio. O aumento da pressão entre o perióstio e o osso resulta em reabsorção e avulsão do perióstio para aposição de osso novo. 2, no curso do crescimento, outro fator participa da adaptação funcional, que é a placa de crescimento, respondendo às cargas a ela impostas (Hert, 1990.). Van der Meulen e Carter (1995) apresentaram um modelo matemático do desenvolvimento do osso que mostra que a escalada ontogênica no desenvolvimento dos ossos longos é consequência da resposta dos mesmos em crescimento ao estresse criado durante a atividade física dinâmica, e não uma característica de fatores genéticos intrínsecos.

A partir dessas idéias, observa-se, na literatura, que está bem evidente que as cargas mecânicas possuem um papel importante no crescimento normal (Blackman e col, 2000). Lammers e col. (1998) observaram que a carga muscular afeta o crescimento ósseo e pode determinar a forma e o tamanho ósseo. Para os autores, o tamanho do osso é afetado pela condição muscular, porém a forma do osso não é afetada. Outro experimento utilizou seis períodos curtos de cargas

mecânicas com o dobro da força aplicada daquela medida na locomoção normal, na ulna de ratos. Ele mostrou uma inibição da reabsorção óssea, e um estímulo da deposição óssea, independentemente do controle hormonal sobre o osso (Hillam e Skerry, 1995).

Os autores, Biewener e Bertram (1994), utilizaram pintos para estudar a resposta do osso ao exercício e ao desuso. Um grupo foi submetido a corridas em esteira com um peso adicional no tronco de 20% do peso corporal. Um segundo grupo foi submetido a um secção completa de um dos ciáticos com 2 semanas de vida e, finalmente, um terceiro grupo cresceu em condições de sedentarismo. As análises da massa e comprimento ósseos, espessura cortical, curvatura longitudinal foram realizadas. O estudo mostrou um aumento da área de corte transversal da cortical do osso em 16% com o exercício. Houve um aumento da massa óssea em 10% nos pintos com 8 semanas de vida, e mantido com 12 semanas. Nos pintos submetidos à deservação do ciático, houve um decréscimo de 19% na massa óssea, 8% na área da cortical, e um encurtamento da tíbia de 7% com 8 semanas de vida, e de 14% com 12 semanas. O lado não deservado mostrou resultados semelhantes aos grupos de sedentários e de exercício, sugerindo uma redução geral do crescimento com o desuso do membro de apoio. Parece claro com este estudo que cargas funcionais, em níveis moderados, são necessárias para o crescimento normal e para a manutenção da massa óssea. Também o aumento das cargas sobre ossos em crescimento leva a mudanças adaptativas benéficas ao menos quando a duração ou a intensidade não é excessiva. Porém, cabe à ciência tentar definir qual é o ponto onde o exercício torna-se “excessivo” e que pode retardar o crescimento esquelético normal (Biewener e Bertram, 1994).

Em relação aos modelos animais, quando são utilizados ratos nos estudos das respostas ósseas, às cargas, observa-se que a atividade física normal possui efeito sobre o osso e o pico de estresse ósseo é tipicamente reproduzido durante a locomoção na gaiola. Ainda, as forças de reação do solo nos membros são determinadas pela segunda lei de Newton, isto é, força é igual a massa vezes a aceleração. A aceleração reflete o nível de atividade, e a massa, a massa corporal. As forças articulares são proporcionais às forças de reação do solo e o estresse ósseo é proporcional às forças articulares. Se compararmos dois ratos com o mesmo nível de atividade, o estresse ósseo será proporcional à sua massa corporal. Então, além do trabalho muscular, a massa corporal e a aceleração do movimento

também têm efeitos na resistência e massa óssea (Turner, 2000).

O estresse ósseo ainda pode ser modificado por outros fatores. Por exemplo, regiões distais na tíbia exibem maior ganho de massa óssea do que na porção proximal, e de efeito mínimo na coluna vertebral quando ratos em crescimento foram submetidos a exercícios na esteira (Blackman e col, 2000). Outro fator de influência na diferença de massa óssea entre as regiões, poderia ser o aumento da pressão fluída criada pela gravidade. Há um gradiente entre a porção proximal do osso e a porção distal. Voluntários submetidos a repouso no leito, com os membros inferiores elevados, mostram aumento de massa óssea no crânio. Este efeito acontece também em experimentos com animais. Possivelmente, as células ósseas são sensíveis às pressões, e os osteoclastos são inibidos pela pressão dos fluídos enquanto os osteoblastos são estimulados (Iwamoto e col., 1999). Outro exemplo da diferença de gradientes das forças é que em ginastas, a magnitude das forças de reação, durante uma aterrissagem, é maior do que as forças de compressão na coluna lombar, pois as articulações e tecidos moles distais a L₅-S₁ atenuam a força do impacto. Os esforços que as ginastas empreendem para manter uma posição corporal ereta e rígida ao término dos movimentos de aterrissagem e de outros movimentos, tendem a diminuir esta atenuação do impacto com possíveis lesões por sobrecarga na própria coluna ou, mais provavelmente, nos membros inferiores (Hall, 1986).

Mesmo com as evidências de que o osso é capaz de responder e adaptar-se às mudanças no seu ambiente mecânico, dados mostram que muitas alterações ósseas são resultado do efeito de estresses anormais. Porém, estudos prospectivos comparativos produziram resultados diferentes entre eles, especialmente no osso em crescimento, não podendo concluir de maneira satisfatória sobre os limites em que as forças não teriam efeito prejudicial (Golding, 1994). De qualquer maneira, a importância dos fatores mecânicos locais pode ser comprovada na regeneração óssea das fraturas. Sabe-se que eles podem influenciar as fases da formação e da remodelação do calo ósseo. A mobilidade cíclica e forças de cisalhamento causam uma proliferação e uma produção celular nas fases iniciais da cicatrização de fraturas e também na remodelação das mesmas (Carter e col., 1998).

Se os fatores mecânicos do exercício podem influenciar a quantidade e a qualidade do osso depositado, esta influência depende do modo, da duração, da intensidade e da frequência da atividade. E se realmente, os aspectos específicos

do osso relacionados ao exercício podem ser associados com os efeitos benéficos, no osso em crescimento, então os regimes de exercício podem ser designados para prevenir os aspectos negativos e maximizar os positivos (Judex e col., 2000). Desta forma, a massa corporal pode ser um indicador *in vivo* de carga, e esse indicador influencia o crescimento da geometria transversal em ossos longos Van der Meulen e col. (1996).

A influencia das cargas mecânicas sobre o osso sempre foi motivo de estudos para os pesquisadores do assunto, e a busca de métodos de observações procura ser mais próximo do ambiente natural possível. Lanyon e Smith (1969) publicaram um dos primeiros estudos com strain gauges (sensores de deformação) coladas no osso de ovelhas vivas, e a análise de dados no animal durante a locomoção, *in vivo*. Os mesmos autores realizaram outro estudo (1970) durante a marcha quadrúpede normal em ovelhas, e mostraram que este método permite coletar dados das deformações dos ossos durante as atividades normais (Lanyon e Smith, 1970).

Lanyon e col. (1975), referiram que circunstâncias mecânicas podiam influenciar profundamente o curso do crescimento, da remodelação e do reparo do osso; ainda, que a instrumentação da superfície óssea com strain gauges possibilitou coletar dados sobre a deformação do osso em diversas atividades nos animais. Estes dados possuem limitações, pois são referentes a uma pequena área do osso, porém são importantes, já que fornecem informações de como o osso responde com cargas a ele aplicadas, sendo um dos poucos métodos que fornecem dados diretos. A preocupação dos autores é se podemos generalizar as informações de uma espécie para aplicar em outra. Partindo deste pressuposto, os autores aplicaram strain gauges na tíbia de voluntários e testaram os efeitos da caminhada na esteira, com calçado, sem calçado e no concreto. A intenção dos autores não era investigar a tíbia *per se*, mas estabelecer se as generalizações dos estudos com cargas no osso de animais eram as mesmas no homem. Eles assumiram que provavelmente as informações obtidas com animais tenham a mesma significância no homem, pois a compressão mostrou resultados semelhantes que os estudos com ovelhas e porcos durante a locomoção.

Por outro lado, Carter e col. (1980) aplicaram strain gauges em 5 locais da ulna e rádio de cães, e analisaram o comportamento destes ossos durante a caminhada por no mínimo 7 dias. Os resultados mostraram estresses longitudinais e

de cisalhamentos significativos na diáfise dos dois ossos. Um estresse tênsil longitudinal foi registrado na superfície convexa dos ossos e forças compressivas na superfície côncava. Os autores referem, com este estudo, que as condições *in vivo* são muito complexas, e as análises utilizando uma única implantação de strain gauges são de valor muito limitado.

Mas, Burr e col., (1996) mostraram que microdeformações podem ser produzidas na tíbia humana durante atividades físicas vigorosas. As medições foram realizadas através de strain gages colocadas nas tíbias de 2 voluntários. Foram duplicadas as condições de campo militar com o uso de botas. O dados foram coletados durante caminhada de 5,0 Km/h, corrida leve (10,15 Km/h) e corrida acelerada (13,88 Km/h), caminhada carregando pesos de 17 Kg, caminhada ou corrida leve subindo ou descendo ladeira, e corrida subindo ou descendo ladeira em zigue-zague. As forças de cisalhamento na corrida no plano horizontal atingiram o dobro da caminhada na mesma superfície. Taxas de forças de compressão foram mais altas durante a corrida acelerada e a corrida ladeira abaixo, e menor durante caminhada no plano horizontal com ou sem pesos. Taxas de tensão foram maiores durante a corrida acelerada no plano horizontal. Taxas de cisalhamento atingiram níveis mais altos na corrida acelerada no plano horizontal. Desta forma, as taxas de deformações foram 2 a 3 vezes mais altas para atividades físicas vigorosas na corrida do que para caminhadas. As medidas de deformações na tíbia humana foram menores do que medidas prévias em animais (cavalos de corridas). Este estudo foi a primeira coleta de dados *in vivo* sobre forças atuantes na tíbia humana, durante atividade vigorosa intensa, e os resultados obtidos podem ter implicação na etiologia das lesões ósseas por estresse. Sabe-se ainda, que as deformações e as taxas de deformações podem duplicar ou triplicar durante a atividade física vigorosa, porém não alcançam as magnitudes de microdeformações registrados em animais (Rubin e Lanyon, 1982).

Burr e col. (1998), achavam que microlesões acumuladas no osso eram positiva e linearmente correlacionadas com a redução do módulo elástico do osso. Eles testaram a hipótese de que o acúmulo de danos ocorre mais rapidamente nas corticais ósseas sujeitas à tensão, porém as quebras no crescimento ocorrem mais nas corticais submetidas à compressão. Mas observaram que um acúmulo significativo de microlesões não é detectado até o osso perder 15% do seu módulo elástico. Houve significativamente mais microlesões na cortical óssea sujeita à

tensão, mas a média do tamanho das microlesões foi maior na cortical sob compressão. O significado destes achados é que o acúmulo de microlesões no osso interfere nas propriedades mecânicas do osso reduzindo realmente seu módulo elástico e que estes danos acumulam mesmo mais rapidamente nas corticais sob tensão, porém um dano ao crescimento é maior nas zonas sob compressão.

Judex e col. (2000) estudaram os efeitos da magnitude, taxa e gradiente das forças de deformação atuantes nos metatarsos na corrida em galos em crescimento, durante 8 semanas. As forças foram significativamente maiores na corrida do que na caminhada. A taxa das forças medidas na corrida foi 136% maior.

Um outro estudo para estimar o limiar de força de deformação em três locais diferentes ao longo da ulna de ratos adultos, foi conduzido por Hseih e col. (2001). Os autores achavam que o limiar de força de deformação poderia ser maior em regiões da ulna que habitualmente são sujeitas a grandes cargas de deformação. Os dados mostraram que a resposta osteogênica na superfície periosteal da ulna depende do nível de pico de deformação. Uma vez ultrapassado o limiar de deformação existe uma reação do osso às cargas mecânicas, com influência maior no local aonde são aplicadas estas cargas.

Por outro lado, quando se observa o efeito de uma carga única sobre o osso, podem-se notar reações deste tecido. Robling e col. (2000) testaram a hipótese de que uma carga simples de 3 minutos já é suficiente para aumentar a formação óssea na tíbia de ratos, também que, quanto mais freqüente, e menor o período da carga, a resposta osteogênica é maior do que uma simples aplicação de 3 minutos de carga.. Os autores viram que 360 ciclos de carga, aplicados com intervalos de 6 ou 4 sessões diárias, representam um estímulo maior da osteogênese do que uma sessão diária com o mesmo número de ciclos de carga. Isto mostra que as cargas mecânicas são mais osteogênicas quando divididas em menores e mais numerosas sessões diárias. Presumidamente, as células começam a tornarem-se “surdas” aos estímulos mecânicos quando os ciclos de cargas persistem ininterruptamente, e, com períodos de repouso entre as sessões de estímulo, a resposta osteogênica pode ser aumentada.

Com estes dados, Robling e col. (2001, (a)) imaginam que as células ósseas são sensíveis e respondem mecanicamente às forças aplicadas. Porém, a microssensibilidade começa a cair imediatamente após o início do estímulo e, sob uma estimulação contínua, o osso é dessensibilizado aos estímulos mecânicos.

Desta forma esta hipótese foi testada e estudado o tempo necessário para restaurar a mecanossensibilidade através da manipulação do tempo de recuperação *in vivo*. Para este propósito, foram usadas 144 tíbias de ratos adultos. Os resultados mostraram a importância de períodos de recuperação das cargas impostas ao osso para restaurar a mecanossensibilidade das células e maximizar os efeitos osteogênicos dos regimes de cargas (exercícios).

Neste aspecto, Turner e Pavalko (1998) dizem que o esqueleto otimiza sua arquitetura durante o crescimento pela adaptação às cargas mecânicas. O mecanismo para esta adaptação envolve múltiplos processos, e que passam também por esta mecanossensibilidade das células ósseas. Estas mudanças estruturais são previsíveis de certa forma através do conhecimento de regras como a de que a adaptação óssea é devida às cargas dinâmicas e não às estáticas; aumentando a duração das cargas, há uma diminuição do efeito adaptativo do osso, e as células ósseas se acomodam ao ambiente de cargas mecânicas, produzindo uma diminuição dos sinais responsivos às cargas.

Como se pode observar até o presente momento, múltiplos fatores possuem ação sobre o tecido ósseo. E em relação à fadiga não é diferente. Yoshikawa e col (1994) usaram 10 cães de caça e os submetem a exercícios rigorosos que causavam fadiga muscular, enquanto a atividade mioelétrica do quadríceps e dos isquiotibiais, e forças de deformação na tíbia distal eram monitoradas simultaneamente. Com colocação de strain gauges na tíbia. Os dados indicaram fadiga muscular, após 20 minutos de exercícios. As forças de deformação e as de cisalhamento aumentam significativamente em ambos, na compressão e na tensão da tíbia, e na força de cisalhamento no córtex de tensão. A fadiga muscular está associada com um aumento da deformação no osso. Fyhrie e col. (1998) sugeriram que a taxa de forças sobre o osso, aumenta após a fadiga, e mais em jovens. Os autores acham que é a taxa das forças, ao invés da magnitude das forças, que provavelmente causam uma maior prevalência de fraturas de estresse.

Quando se pensa em compressão axial sobre os ossos longos e a correlação com a interferência sobre o crescimento, existem dados mostrando esta associação. Lerner e col. (1998) acham que existe uma correlação linear entre as taxas de crescimento e a magnitude do estresse compressivo presente na placa de crescimento durante as atividades normais. Estudando o estresse e as forças de deformação no fêmur distal de coelhos, eles observaram que estas medidas

ocorrem principalmente no centro da placa de crescimento, no plano anterior, e que o padrão do estresse varia com a idade. Como as forças axiais são mais consistentemente relacionadas às taxas de crescimento, foi dada maior ênfase para esta correlação, incluindo a variação entre as condições de carga, de animais e de planos das cargas. Um dos achados interessantes deste estudo foi o de que a compressão axial está fortemente associada com a redução do crescimento no plano anterior nas idades dos coelhos estudados. Os autores encontraram variações entre os animais, e eles fazem referência ao fato de que a correlação entre o estresse e a taxa de crescimento sugere que as variações interanimais, nos modelos geométricos ou taxas de crescimentos ósseos, podem ser significativas.

Se esta correlação é verdadeira então um dos possíveis efeitos da compressão axial do osso é a supressão do seu crescimento longitudinal (Torrance e col., 1994). Esta observação sugere que a carga mecânica pode suprimir a ossificação endocondral via alteração no metabolismo dos condrócitos, ou acúmulo de microlesões na placa de crescimento. Assim, as cargas derivadas dos exercícios físicos podem influenciar o crescimento longitudinal dos ossos longos, apesar de que os efeitos variem consideravelmente. Relatos a respeito de relação entre o crescimento da placa e as forças mecânicas ainda não são definitivos (Ohashi e col., 2002).

Por exemplo, Simon e Papierski (1982), teorizaram que o bipedalismo experimental produzia aumento nas forças compressivas em ratos. Já que os ratos de laboratório não se locomovem continuamente, e que cada membro é estressado somente por um pequeno período em cada ciclo, eles estudaram o bipedalismo nestes animais. O estudo mostrou uma diferença na resposta entre fêmeas e machos, aonde as fêmeas exibiam um fêmur mais longo. Os autores observaram que aumento nas forças compressivas intermitentes aumenta o crescimento dos ossos longos, porém esta resposta é mais pronunciada nas fêmeas.

Também Simon e Holmes (1985) estudaram a histomorfologia da placa de crescimento da tíbia proximal em ratos em relação ao crescimento ósseo quando sujeito a forças compressivas intermitentes, no bipedalismo. As forças são intermitentes, pois um membro está apoiado no solo apenas em uma das partes de cada ciclo do passo. O objetivo do aumento da carga durante a locomoção dos ratos era simular um aumento gradual do peso corpóreo. Foi utilizado o que os autores

chamavam de centrífuga, e que era um eixo de rotação vertical onde se colocavam 60 gaiolas para os ratos a fim de simular hipergravidade. Este dispositivo permitia aumentos da gravidade de 0,1 *g* (onde *g* é 1 gravidade), a partir de 1,1*g* até 2,0 *g*. Os ratos eram sacrificados com 90 dias para o grupo de recém-nascidos, e 30 e 60 dias para os ratos recém-desmamados (o início deste grupo era aos 30 dias após o nascimento). O estudo histológico era realizado com cortes de 5µm, e estes corados com hematoxilina e eosina. Nenhuma diferença foi detectada na histomorfologia da placa de crescimento dentro de cada grupo. No grupo dos ratos submetidos a 30 dias de centrifugação não mostraram diferença significativa. Nos ratos submetidos a 60 dias de centrifugação, houve uma diferença significativa entre o controle (1,0*g*) e os ratos dos experimentos. Aconteceu uma diminuição importante da espessura da zona proliferativa com ruptura das colunas desta zona. Já no grupo de recém-nascidos, não houve diferença com nenhum aumento da gravidade na espessura ou na quebra do padrão celular da placa de crescimento. Os dados dos autores sugeriram que os valores de *g* e a duração da centrifugação são fatores importantes nos efeitos das forças compressivas, intermitentes e progressivas, produzidas para simular aumentos progressivos do peso corporal, no crescimento dos ossos dos membros. Vico e col. (1999) mostraram que após um período de 4 dias, a centrifugação, criando 2*g*, resultam em uma redução na formação endocondral do osso usando a tíbia e o úmero. A placa de crescimento mostrou uma diminuição da espessura e lesões, o que revela ser sensível às forças de compressão aplicadas.

Com estas observações relatadas na literatura (de que o crescimento longitudinal e aposicional são influenciados pelos estímulos mecânicos), Robling e col (2001, (b)) testaram a hipótese, em modelos não invasivos, de que cargas estáticas diárias e rápidas (10min/dia) possuem um efeito inibitório na formação óssea aposicional na diáfise da ulna de ratos em crescimento. A idéia dos autores era de que a supressão do crescimento ósseo longitudinal induzido por cargas na ulna de ratos em desenvolvimento é proporcional à taxa de tempo da carga, e que as dimensões da placa e populações de condrócitos são reduzidas. Três grupos de ratos foram submetidos a cargas estáticas de 17N, 8,5N, e dinâmicas de 17N. A formação periosteal foi diminuída em 28% a 41% nos grupos de compressão estática do osso, porém não afetou a formação endosteal. As cargas dinâmicas aumentaram significativamente ambas as superfícies. Após 2 semanas de experimento, a ulna submetida a cargas de compressão ficou aproximadamente 4%

mais curta do que a contralateral no grupo de carga estática e dinâmica com 17N, e, aproximadamente, 2% mais curta no grupo de 8,5N. Estes resultados sugerem que a supressão do crescimento é proporcional à magnitude do pico de carga aplicada, independentemente se a carga for estática ou dinâmica. A supressão do crescimento foi associada com mudanças na placa de crescimento distal, incluindo um aumento na altura da placa, aumento na altura da zona hipertrófica; e aumento no número de lacunas das células hipertróficas.

Da mesma maneira, Ohashi e col. (2002) testaram 3 diferentes cargas na ulna de ratos. Eles utilizaram 17N, 8,5N e 4N, também durante 10 minutos diários por 8 dias. Além disso, para investigar a recuperação após os impactos, um dos grupos foi examinado 7 dias após a cessação das cargas. O crescimento longitudinal foi suprimido, dependendo da magnitude da carga aplicada. No grupo com 17N, a taxa de mineralização na placa distal foi completamente suprimida e não houve recuperação. Porém, nos grupos com 8,5N e 4N, a taxa de mineralização iniciou um restabelecimento 1 semana após a parada da aplicação das cargas. No grupo de 17N, a altura da placa e a da zona hipertrófica foi significativamente maior do que o controle; o número de condrócitos hipertróficos aumentou e algumas mudanças traumáticas como microfraturas foram encontradas. Também, no grupo de 17N, houve uma diminuição da mineralização e da invasão capilar abaixo da placa, embora o número de condrócitos sintetizadores do fator de crescimento vascular endotelial tenha aumentado. Desta forma, os resultados mostraram uma supressão do crescimento dependente da magnitude da carga aplicada à ulna. De acordo com os autores, somente cargas altas impediriam o crescimento da placa.

Porém, apesar de todos os dados citados, existem certas dificuldades para estudar-se a placa de crescimento como unidade estrutural devido às propriedades biomecânicas dos tecidos dela e ao redor dela. Novas técnicas, como a nanoindentação, têm sido empregadas para definir as propriedades ultraestruturais da porção mineralizada da placa de crescimento. Ela minimiza muitas desvantagens comuns aos testes mecânicos convencionais nos tecidos biológicos. Os dados do estudo com nanoindentação suportam o conceito de que a placa de crescimento, assim como os tecidos circundantes, são heterogêneos em termos de propriedades micromecânicas (Young-In Lee e col. (1998).

Como observado, embora existam estudos sobre o efeito das forças de compressão nos ossos, mesmo em modelos animais, quando *in vivo*, deve-se

aplicar a carga ao osso através dos tecidos moles adjacentes, e, por isso, a viscoelasticidade destes tecidos pode afetar o modo como a força aplicada é transferida ao osso. Hsieh e col (1999) observaram, nas regiões da articulação ulnocarpal e diáfise da tibia, que o pico de deformação é proporcionalmente linear à carga aplicada, porém diminui logaritmicamente à medida que a frequência vai aumentando, indicando um efeito viscoelástico dos tecidos moles que rodeiam estas regiões na dissipação da energia. Conseqüentemente, um experimento desenhado para testar o efeito da frequência de carga na formação óssea na ulna e na tibia de ratos, deve empregar progressivamente grandes cargas com frequências altas, para garantir uma magnitude consistente de pico de força de deformação no osso.

Pode-se ver que as cargas mecânicas exercem, sem dúvida, efeito sobre o desenvolvimento do tecido ósseo, desde a sua formação, e que elas continuam atuando após o final do crescimento ósseo, uma vez que este tecido é extremamente dinâmico e sensível ao ambiente de carga. Os estudos sobre os efeitos destas cargas nas zonas de crescimento ósseo mostram, também, uma influência no desenvolvimento do comprimento dos ossos longos. A grande dificuldade é definir um limiar para que estes estímulos não ultrapassem uma linha aonde começam a causar uma diminuição da velocidade de crescimento da placa, ou mesmo a parada deste crescimento.

Um número de modelos experimentais foi testado, através dos anos, para investigar os efeitos das cargas mecânicas na formação óssea. Um dos modelos de interesse é a aplicação da carga axial sobre a ulna de ratos *in vivo*. Este modelo foi desenvolvido por Torrance e col. (1994), e, mais tarde, difundido por Mosley e col. (1997).

Mosley e col (1997) realizaram 1200 impactos na ulna de grupos de ratos anestesiados para avaliar a mudança na cortical óssea e sua curvatura, durante 10 minutos diários, a uma frequência de 2 Hz. Eles ainda utilizaram quatro grandezas de impactos para simular diversas situações de movimentação dos ratos. Os autores sugerem que uma força -0.004N simularia situações de exercícios, embora a tenham utilizado para a ulna. Ainda no estudo desses autores, foram implantados *strain gauges* na ulna de um grupo de ratos, *in vivo*, e estes eram lançados de 30cm de altura para que esta medida de $-0,004\text{N}$ fosse registrada.

A grande gama de estudos e as dúvidas que ainda pairam sobre os estresses gerados pelo exercício e esporte, sobre o sistema músculo-esquelético,

deve-se ao fato de as situações são inúmeras e multifatorial. Em observações específicas pode-se obter informações que auxiliam na compreensão sobre tais efeitos. Por exemplo, Arampatzis e col. (2001) fazem referência entre a “rigidez” dos membros inferiores nos esportes, a elasticidade ou viscoelasticidade das superfícies, e a energia mecânica gerada em uma série de saltos realizados por atletas femininas. Um aumento desta rigidez, e aqui se entende por extensão dos membros inferiores e posição neutra dos tornozelos na chegada ao solo, causa um aumento da energia absorvida por uma superfície sustentada por molas semelhante ao solo utilizado por atletas de ginástica. Por outro lado, nas ginastas a pontuação também é dada pela chegada ao solo com a extensão completa dos membros inferiores. E, como citado pelos autores acima, a correlação entre a “rigidez” dos membros inferiores e a articular é muito alta no joelho. Parece claro para os autores que a articulação do joelho possui um papel importante na regulação da rigidez dos membros inferiores na prática de esportes.

Embora pareça claro, também, que as cargas influenciam o crescimento longitudinal dos ossos longos, a relação entre as diferentes magnitudes e o efeito na placa de crescimento permanece sem respostas devido aos diferentes resultados com utilizações de diferentes cargas (Ohashi e col., 2002). Markolf e col. (1994), encontraram forças que podem chegar a três vezes o peso corporal no punho de atletas. Desta maneira, pensamos que a grandeza de 3,5 vezes o peso corporal, encontrada por Dyhre-Poulsen (1987) é uma medida adequada para estudos da natureza desta tese. Mesmo que esta magnitude possa não expressar a medida real de todos os gestos realizados na ginástica. Conta-se, ainda, com o fator ainda de que os muitos experimentos relatados na literatura não utilizaram magnitudes com proporção ao peso corporal dos animais como nesta tese, e sim com forças em Newton ou aumentos na gravidade até 2g.

3.5 - Mecanismo de Lesão na Placa de Crescimento

O osso é capaz de responder e adaptar-se às mudanças no seu ambiente mecânico, porém estudos prospectivos produziram resultados diferentes entre eles, especialmente no osso em crescimento (Judex e Zernicke, 2000).

A interação biomecânica entre as diferentes zonas da placa de crescimento e o tipo de forças aplicadas resulta em padrões de lesões reproduzíveis, e várias classificações têm sido propostas para estas lesões. É aceito que a fratura nesta região ocorre na zona hipertrófica, e uma das explicações pode estar relacionada às diferentes características micromecânicas do osso trabecular em cada lado da placa (Young-In Lee e col., 1998). Frost e Jee (1994) relatam que as falhas ósseas nos ossos longos das crianças iniciam no córtex ósseo ou na zona logo abaixo da placa de crescimento.

Também, a compressão e a tensão na placa de crescimento podem mudar o padrão ósseo normal. Durante o período de crescimento rápido, o sistema esquelético, e particularmente a placa de crescimento, são maximamente sensíveis a mudanças na magnitude, na direção e na duração das forças aplicadas (Irani, 1995). Em relação a estes fatos, uma variedade de forças, agudas ou crônicas, podem resultar em uma lesão na placa de crescimento. A forma mais comum seria a aguda (Salter e Harris, 1963).

E para mostrar que a compressão exerce efeito sobre a zona de crescimento, Arkin e Katz (1956) estudaram coelhos que não foram submetidos a apoio dos membros, no solo. Isto foi possível com a utilização de um aparelho gessado que impedia este apoio. Eles observaram um aumento no crescimento longitudinal da placa de crescimento, nos membros engessados. Por outro lado, pressões moderadas e intermitentes sobre a placa, mostraram uma diminuição do crescimento da região. Simon (1978) foi outro autor a realizar estudos neste campo. Ele observou que uma sobrecarga excessiva e dinâmica pode diminuir o crescimento da placa, porém o aumento leve da compressão dinâmica (impactos repetitivos) favorece o crescimento.

Nos estudos clínicos, uma parada do crescimento da placa distal do rádio de crianças que praticam ginástica excessivamente, tem sido observada. Possivelmente pelo efeito compressivo sobre esta articulação Foi mostrado que as forças geradas pelos ginastas, no punho, podem chegar a três vezes o peso do corpo, quando utilizam o cavalo, um dos aparelhos da ginástica. Então, estas cargas repetitivas, rápidas e extremas, provavelmente produzem mudanças na placa distal do rádio (Markolf et al, 1994). Em relação às forças de compressão a que a placa de crescimento pode estar submetida na ginástica, Dyhre-Poulsen (1987) estudou o salto “split leaps” em um grupo de 14 atletas de ginástica rítmica com média de

participação neste esporte de 3,9 anos, em uma plataforma de força. Um dos dados registrados foi relação entre a altura máxima adquirida no salto e o componente vertical da força de reação do solo. A amplitude máxima alcançada em uma atleta de 54Kg, deste componente de reação vertical, foi de 1900N, o que equivaleu a aproximadamente 3,5 vezes a força produzida pelo peso corporal da ginasta no momento do salto.

Ainda, foi observado que a placa possui propriedades viscoelásticas por ser um tecido biológico; ou seja, a presença de uma porção líquida (viscosa) no tecido influencia na propriedade elástica da placa. Isto confere uma característica, que é a de requerer grandes forças, com taxas progressivas de carga até sua fratura completa (Bright et al. 1974).

Outro fator que pode estar envolvido na produção de lesões da placa de crescimento pode estar relacionado ao “estirão” da puberdade. Alexander (1976) sugere que, durante este período, o risco de lesão pode aumentar devido à “fraqueza” transitória da zona juncional, da placa de crescimento.

3.5.1 - A Fratura da Placa de Crescimento

Algumas classificações das fraturas da placa de crescimento têm sido propostas, e uma das mais utilizadas é a de Salter e Harris (1963), que descreve cinco tipos diferentes de fraturas (figura 4). Na fratura tipo V, o dano pode ser imperceptível ao exame radiológico, e é uma das especulações do que pode acontecer com impactos repetitivos e de magnitudes altas, no esporte. Frequentemente não é diagnosticada e pode levar a um distúrbio do crescimento com deformidade progressiva do osso atingido. Desta forma ela pode exibir uma parada do crescimento enquanto que o local não atingido crescerá normalmente. Felizmente este tipo não é comum.

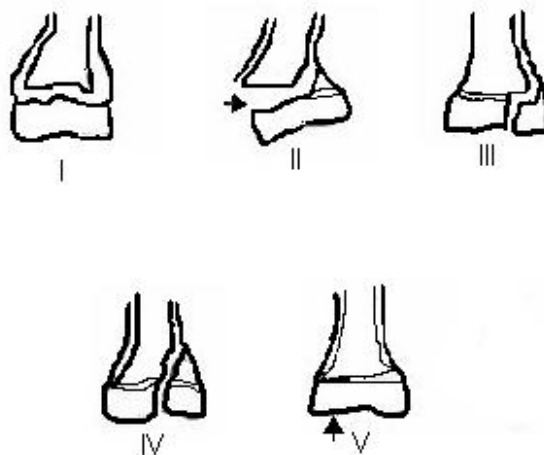


Figura 4: A classificação das fraturas na placa de crescimento de Salter –Harris. No tipo I há uma separação completa da placa sem fratura óssea. Tipo II, um fragmento proximal à placa permanece preso ao fragmento distal. Tipo III, um fragmento distal à placa é separado junto com a sua porção da placa. Tipo IV, o traço de fratura passa através da placa e separa um fragmento da metáfise e um da epífise. Tipo V, fratura por compressão da placa.

Porém, em determinados momentos, pode existir um estímulo na placa de crescimento além do normal após fratura de ossos longos. Especula-se que exista um aumento da atividade metabólica na placa em casos de fratura onde a consolidação se dá com encurtamento ósseo na diáfise, embora este fenômeno ainda não tenha sido documentado em laboratório. Etchebere e col (2001) realizaram um estudo em 18 pacientes com idade média de 6,1 anos, e que sofreram fratura do fêmur, a fim de observar o metabolismo ósseo após esta lesão. Cintilografia óssea de três fases foi realizada em todos eles com intervalos de 2 a 5 meses, 6 a 12 meses e 18 a 24 meses da lesão, controlados com um grupo de 10 crianças e idade média de 7,5 anos. O estudo envolveu a placa de crescimento do fêmur distal e da tíbia proximal. Na análise visual foi encontrado um aumento da atividade no fêmur distal nas duas primeiras fases do estudo, porém não foi encontrada mudança significativa da atividade durante as três fases de análise na placa proximal ou distal da tíbia. Os valores das taxas da análise semiquantitativa da placa distal do fêmur fraturado em relação ao não fraturado foram significativamente

maiores do que o grupo controle assim como para a tíbia proximal. O exame foi capaz de mostrar que existe uma atividade aumentada na placa de crescimento do fêmur distal e na tíbia proximal em crianças com fratura de fêmur. Talvez este aumento do metabolismo seja responsável pela compensação do encurtamento provocado pela fratura e, desta forma, pode-se vislumbrar que a placa responda às demandas mecânicas a ela impostas, de acordo com a necessidade.

Cottalorda e col. (1996), criaram barras ósseas na placa de crescimento do fêmur de coelhos, através de furos de diâmetros diferentes, a fim de estudar a força para causar uma epifisiólise (definida no estudo como uma separação da epífise do fêmur da metáfise adjacente) em relação ao tamanho da barra criada. Três semanas após a criação da barra, no fêmur foi realizado um estudo mecânico de distração da placa. A força requerida para provocar uma epifisiólise não foi diferente nos diferentes diâmetros das barras ósseas, que foram criadas no estudo. Os autores acham que a barra não altera a resistência da cartilagem de crescimento à tração. Uma das possibilidades é a de que a ossificação da barra poderia não estar totalmente formada com três semanas de experimento. Um dos problemas deste estudo é que não foi realizada uma análise histológica da barra. Porém, a partir dos achados, pode-se inferir que lesões que provocam ossificações incompletas na placa não alteram a resistência da mesma, ao menos nos períodos próximos à lesão.

Em estágio experimental, transplante em bloco da placa de crescimento está sendo proposto para disfunções localizadas nesta região. Um bloco ulnar metáfise-placa-epífise com preservação da vascularização em ambas as extremidades do enxerto tem mostrado sobreviver na diáfise radial de cães. Porém, este bloco freqüentemente falha na interface entre a epífise transplantada e a interface diafisária do hospedeiro, mas é uma das promessas futuras no campo das lesões graves da placa (Robertson, 1990).

3.6 - O Modelo Animal

Os usos de animais em experimentos científicos e em atividades didáticas são necessários, especialmente para o avanço dos conhecimentos na área da saúde do homem (Raymundo e Goldim, 2000). No fim de todas as especulações, o que se pretende, na realidade, é que os resultados dos modelos animais possam ser transferidos para a prática clínica no ser humano (Aerssens e col., 1998). Hsieh e col. (1999) dizem que, para estudar as respostas adaptativas do esqueleto às cargas mecânicas impostas, modelos animais devem ser utilizados.

Mas, quando se especula a respeito do crescimento e desenvolvimento da placa, em estudos que utilizam modelos com ratos, deve-se levar em conta as observações de Raab-Cullen e col. (1994). Eles acham que modelos com ratos em crescimento possuem limiares menores para responder às pressões dos tecidos moles, e que o papel destes tecidos deve ser esclarecido nas respostas ósseas às compressões. De importância, é a observação dos autores ao dizerem que um estudo com cargas múltiplas oferece a melhor oportunidade para entender a regulação mecânica do osso. Desta forma, a carga progressiva do nosso estudo vai ao encontro desta idéia.

Em trabalhos onde se deseja observar as forças que atuam sobre o osso, o uso de “strain gages” é o padrão ouro para estudos em ossos *in vivo*. Em humanos, porém, existem limitações como a necessidade de procedimentos cirúrgicos e o uso de cola à base de cianoacrilato, que não é aprovado por instituições como o FDA, para uso em humanos. O desenvolvimento de alternativas no uso de substância de fixação, como o polimetilmetacrilato, tornou o uso de “strain gages” em humanos mais comum (Hoshaw e col., 1997). Mas, mesmo assim, como se trata de procedimento invasivo, existe uma validação na idéia dos experimentos com animais.

Autores com Howard e col. (2000) reforça a idéia do estudo com modelos animais, a respeito das forças atuantes sobre o osso. Eles estudaram as forças de reação do solo em uma plataforma de força, para testar a recuperação da função

neurológica do nervo ciático após lesão e sutura do mesmo, em ratos, e chegaram à conclusão de que o uso das forças de reação do solo na deambulação, podem trazer as informações a respeito de muitos problemas, ortopédicos, neurológicos, etc. Os autores citam que a maior vantagem do uso das forças de reação do solo é que são medidas diretas exercidas nos animais dos experimentos, da mesma forma como é o uso de “strain gages”. Também afirmam que, em outras atividades, o método pode ser empregado com outros parâmetros nas forças de reação do solo.

Também Rowan (1987) acha que alguns experimentos com animais podem ser justificados, e é difícil negar o valor destes experimentos no desenvolvimento científico. Porém, o custo aos animais deve ser reduzido, refinando o desenho da pesquisa, reduzindo o número e o sofrimento a eles impostos.

Quando se pensa em adotar um modelo animal para se estudar as relações respectivas ao desenvolvimento ósseo, autores relatam que não existe um modelo animal ideal para estudar as desordens ósseas. É necessário que se levem em consideração alguns aspectos, como a praticidade de manipulação e, neste particular, os ratos são espécies práticas. Os ratos são, de longe, os animais mais utilizados nas pesquisas ósseas por uma série de vantagens: baixo custo; fácil armazenamento e cuidados; vida média curta, o que permite estudos longitudinais com maior facilidade; possui uma genética conhecida e o seu metabolismo mineral é bem documentado. (Aerssens e col., 1998). E, em relação ao custo operacional, é mais vantagem o estudo com espécies pequenas como os ratos (Massone, 1988).

Mesmo com estas variáveis na escolha do modelo animal a ser utilizado, em estudos sobre o osso, deve-se considerar a semelhança histológica com o ser humano, para que os resultados possam ser inferidos ao homem. No que se refere à placa de crescimento ósseo, Thorp e Dixon (1991) examinaram esta região no joelho e no quadril de ratos e de dois monotremos australianos (platypus, *Ornithorhynchus anatinus* e achidna, *Tachyglossus aculeatus*). Os autores encontraram algumas diferenças entre a placa de diferentes espécies, mesmo entre mamíferos. São necessários mais estudos em outros mamíferos para que se possa definir as reais implicações destas diferenças, principalmente se levarmos em conta que muitas inferências que a literatura tem realizado são a partir de estudos em ratos.

Hsieh e col. (1999) publicaram um estudo sobre os efeitos da viscoelasticidade dos tecidos nos modelos de cargas mecânicas no osso, usando

ratos. Os autores viram que os tecidos que circundam, especificamente a tíbia e a ulna, tendem a “filtrar” os componentes de alta frequência das cargas aplicadas. Este efeito, devido à viscoelasticidade, pode confundir os resultados dos experimentos que variam na frequência e na taxa de carga aplicada. Porém, Turner (1999), um dos autores do estudo acima, relata que o sistema de aplicação das cargas é importante na validação dos dados. Mesmo com alguma variabilidade existente entre os sistemas de aplicação de cargas conhecidos. Devido à esta variabilidade que poderia existir nas aquisições de dados desta natureza, o autor recomenda que a magnitude da carga aplicada seja controlada através de um dial, e com uma célula de carga no sistema, para monitorização constante desta carga aplicada. Desta forma, seria fácil corrigir os valores das cargas.

Também se especula a respeito das influências genéticas na estrutura e na biomecânica óssea e que poderiam determinar a escolha do animal a ser estudado. Estudos para testar a utilidade de modelos congênitos para observar a influência genética na fragilidade óssea tem sido realizados. Caracterizando a massa óssea, geometria e biomecânica do osso em 11 ratos de linhagens diferentes, foi mostrado que existe uma variação considerável na estrutura óssea, densidade mineral óssea irreal (DMOi) e fragilidade fenotípica entre os ratos. Interessante é que a variabilidade no fenótipo esquelético dos ratos foi específica para determinados locais, sugerindo que não é apenas um gene que regula a fragilidade óssea em todos os sítios ósseos. Por exemplo, a linhagem Copenhagen 2331 (COP) teve as maiores propriedades biomecânicas no colo femoral, porém modesta resistência no meio da diáfise, comparada com outras linhagens. Conseqüentemente, ratos COP parecem possuir alelos que aumentam especificamente as propriedades biomecânicas do colo femoral e podem servir como modelo para estudar a influência genética na resistência do quadril. Os ratos noruegueses marrons (BN) e Fischer 344 (F344) podem servir de modelos para a fragilidade vertebral devido à sua relativa fragilidade vertebral lombar. Os ratos F344 também possuem a maior fragilidade femoral e, por isto, parecem carregar alelos que causam maior fragilidade óssea total. Foi identificado ainda, que ratos de linhagens diferentes cruzados, facilitam os estudos da influência genética na fragilidade óssea em locais ósseos com relevância clínica. Lewis (LEW) com F344, são primariamente indicados para fragilidade vertebral e COP com DA para fragilidade do colo femoral. Desta maneira, estes resultados sugerem fortemente que seleções de cruzamento entre linhagens

de ratos podem ser aplicadas para estudar a influência genética na resistência e na estrutura óssea (Turner, 2001).

Aerssens e col. (1998) foram outros autores preocupados com as diferenças entre as espécies quando se pensa em inferir dados de uma às outras. Eles estudaram a composição óssea de 7 vertebrados diferentes, justamente para observar as semelhanças ou as diferenças que possam interferir nas conclusões dos estudos realizados em termos de inferências de um para o outro. Foram estudados, humanos, cães, suínos, bovinos, caprinos, frangos e ratos. Segundo estes autores, na análise bioquímica, o rato foi o que mostrou maior diferença, e os cães mostraram a maior semelhança com o osso humano. Também existiu uma grande variação entre as espécies, na densidade mineral. Desta forma, a contribuição relativa da densidade mineral na competência mecânica do osso é largamente dependente da espécie estudada. Estes dados sugerem que as diferenças interespecies podem ser encontradas em outros experimentos, e parâmetros clínicos e devem ser levados em consideração quando se escolhe o modelo animal para estudo ósseo.

Especificamente em relação à placa de crescimento, existem desvantagens teóricas associadas com os testes nesta região, como uma unidade estrutural. Isto é devido à heterogeneidade, à anisotropia e à viscoelasticidade dos tecidos. Desta forma, caracterizar as propriedades materiais dos tecidos na placa, e ao redor dela, possui numerosas dificuldades. Técnicas têm testado a porção mineralizada da placa de crescimento a fim de definir sua propriedade ultraestrutural. (Young-In Lee e col., 1998; Hsieh Y-F e col., 1999). Turner e Forwood (1994) afirmam que os modelos de cargas na tíbia servem para estudar a formação óssea lamelar como resposta à compressão do osso. Embora esta compressão não seja fisiológica, é facilmente observada *in vivo* e *ex vivo*. Ainda, eles revelam que todos os modelos experimentais apresentam problemas, mas isto não quer dizer que não possam ser cientificamente úteis.

Desta forma, além do aspecto ético nos trabalhos invasivos em humanos, existem dificuldades metodológicas típicas de estudos desta natureza, onde é difícil controlar uma série de variáveis como temperatura ambiental, alimentação, coletas em períodos de competições e outras. Assim, foi adotado um modelo animal, planejado para ser realizado dentro das rígidas normas éticas sugeridas pela bibliografia no trato com os espécimes (Lanziotti e col., 1994) (Flecknell, 1993;

Raymundo e Goldim, 2000). Este projeto segue normas da literatura no trato com animais em experimentos a fim de minimizar a dor e a angústia que estes animais experimentam como cobaias.

Enfim, o modelo com ratos, da amostra deste estudo, foi selecionado por apresentar algumas semelhanças, tanto estruturais como fisiológicas, com a do ser humano. Isto faz com que os resultados talvez possam ser inferidos ao homem (Carlstedt e Nordin, 1989). A estrutura óssea, a cartilagem articular, a inserção capsular e a muscular do quadril do rato, por exemplo, são similares ao homem, apesar da diferença biomecânica atribuída ao roedor ser quadrúpede, e o bipedalismo humano (Bagi e col., 1996).

3.6.1 - Anestesia em Animais de Experimentação

Animais vertebrados possuem vias dolorosas e percepção de dor similar ao homem. Desta forma, estudos experimentais com animais devem empregar técnicas apropriadas de anestesia, e isto deve levar em conta os efeitos que as drogas produzem na homeostase do organismo. A técnica de indução intraperitoneal, por exemplo, é freqüentemente empregada nos animais com dificuldade de acesso venoso como os ratos, uma vez que a massa muscular é pequena e as injeções podem induzir à miosite (Holland, 1993).

Um dos anestésicos mais utilizados é a Ketamina. Ela é um agente anestésico dissociativo que promove anestesia, amnésia e analgesia. (Reich e Silvay, 1989). Nos roedores é ineficaz, até que a dose produza uma depressão respiratória e, nestas taxas, a mortalidade pode exceder 50%, e, por esta razão, ela não dever ser aplicada como agente único (Flecknell, 1993). A suplementação com outras drogas reduzem estes efeitos (Reich e Silvay, 1989; White e col., 1982; Flecknell, 1993).

O uso combinado de ketamina e xilazina, um agente miorreaxante agonista α_2 adrenérgico, oferece a vantagem de produzir um nível adequado de anestesia e analgesia (Flecknell, 1993). Além disto, a combinação de ketamina e xilazina é aprovado para uso veterinário, inclusive, em ratos, sem preocupação com alguns

efeitos renais colaterais, uma vez que o uso de ketamina isoladamente reduz o fluxo urinário e a excreção de sódio (Cabral e col., 1997).

Massone (1988) recomenda o uso de atropina na dose de 0,044 mg/kg por via subcutânea, 10 minutos antes do evento anestésico para evitar possíveis arritmias. A dose de ketamina e xilazina pode ser de 0,1ml/100g de peso do rato de uma mistura de 1ml (50mg) de ketamina e 1ml de xilazina a 2% (20mg), dose suficiente para permitir manipulações incruentas quando administradas por via intramuscular. Caso se faça necessário um tempo maior, a complementação poderá ser feita administrando-se metade da dose original pela mesma via, tomando-se o cuidado de que doses complementares sucessivas acarretam um efeito cumulativo, retardando a recuperação. As doses para procedimentos incruentos normalmente são de 50mg/kg de ketamina e de 10mg/kg de xilazina que podem ser injetados por via intraperioteneal ou endovenosa.

4 - HIPÓTESES

- Hipótese nula: A carga compressiva repetitiva não tem efeito sobre a placa de crescimento dos ossos em relação à velocidade de crescimento e em relação à celularidade.
- Hipótese 1: A carga compressiva repetitiva afeta a placa de crescimento dos ossos, diminuindo a velocidade do seu crescimento e alterando sua celularidade.
- Hipótese 2: A carga compressiva repetitiva afeta a placa de crescimento dos ossos, diminuindo a velocidade do seu crescimento sem alterar a sua celularidade.
- Hipótese 3: A carga compressiva repetitiva afeta a placa de crescimento dos ossos, aumentando a velocidade do seu crescimento e alterando a sua celularidade.
- Hipótese 4: A carga compressiva repetitiva afeta a placa de crescimento dos ossos, aumentando a velocidade do seu crescimento sem alterar sua celularidade.
- Hipótese 5: A carga compressiva repetitiva afeta a placa de crescimento dos ossos, alterando sua celularidade sem alterar a velocidade de crescimento.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta tese foi utilizada a seguinte metodologia:

5.1 - Local de Origem e de Realização

Este estudo teve como local de origem a Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com a colaboração do Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, do Laboratório de Resistência dos Materiais da Faculdade de Engenharia da UFRGS e do Laboratório de Pesquisa em Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os experimentos desta tese foram realizados no Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5.2 - Delineamento

Estudo experimental controlado, de caráter quantitativo, , randomizado para os grupos e cego para as análises.

5.3 - Amostra

Para a realização da pesquisa, foi utilizada uma amostra de 60 ratos wistar, que tinham 28 dias de vida, considerados pré-púberes, divididos em seis grupos, sendo cada grupo composto por dez ratos (gráfico 1).

No grupo 1 foram aplicados cinco dias de carga compressiva repetitiva; no grupo 2, 7 dias de carga compressiva repetitiva; no grupo 3, 9 dias de carga compressiva repetitiva; no grupo 4, 12 dias; para o grupo 5, 12 dias de carga compressiva repetitiva e, para o grupo 6, 21 dias de carga compressiva repetitiva. As coletas das tíbias aconteceram um dia após o término da aplicação da carga

compressiva repetitiva (impactos), com exceção do quinto grupo onde o sacrifício e a retirada das tíbias ocorreu no décimo dia após o término da carga compressiva repetitiva. Para a retirada das tíbias, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, e todos os tecidos moles ao seu redor foram dissecados.

O período pré-púbere e a duração da puberdade foram determinados de acordo com a classificação proposta por Ojeda e Urbanski, citados por Castro e col. (2001) em que o período pré-púbere é do 22° ao 32° dias pós-natal, e o período puberal termina ao redor do 39° dia.

Os ratos foram adquiridos no Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, e também foram mantidos, nesse centro, por um regime de 12h dia/noite com alimentação e água à vontade. Houve a preocupação de fornecer alimentação à vontade, pois se sabe que o período de início da puberdade em mamíferos é muito influenciado pelo estado nutricional e metabólico (Cheung e col., 1997). A temperatura ambiente foi de aproximadamente 21°C. Os ratos puderam ser alimentados até o momento do teste, pois, em roedores, não é necessário período de jejum, a não ser em cirurgias do trato gastro-intestinal. Os testes foram realizados no próprio biotério, minimizando o estresse que os ratos sofrem durante o transporte e o período de aclimatação necessário (Flecknell, 1993).

A pesquisa seguiu os critérios éticos para o estudo com animais (Lanziotti e col., 1994) e foi submetido à aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS.

5.4 - Procedimentos

Os procedimentos do estudo seguiram um cronograma e uma ordem descritos a seguir. Primeiramente foi a construção da máquina de carga compressiva repetitiva (impactos), e a realização de um projeto piloto para testar a viabilidade e o funcionamento da mesma. Em seguida foram realizadas as calibrações, para finalmente serem coletados os dados da carga compressiva, na amostra. Esta seqüência está descrita detalhadamente a seguir.

5.4.1 - A máquina de Carga Compressiva Repetitiva

Para a coleta de dados, foi construída uma máquina geradora da carga compressiva repetitiva (impactos axiais), e com aumentos proporcionais ao ganho de peso pelos animais, para que estes pudessem ser aplicados na amostra (figura 5).

Embora sejam descritas três forças atuantes no momento em que o pé toca o solo no na fase de apoio, a posterior-anterior, a latero-lateral e a de ação vertical-reação do solo, a carga compressiva repetitiva produzida neste estudo baseia-se na força de ação e reação vertical ou, como no caso do posicionamento do membro testado nos ratos, carga compressiva axial.

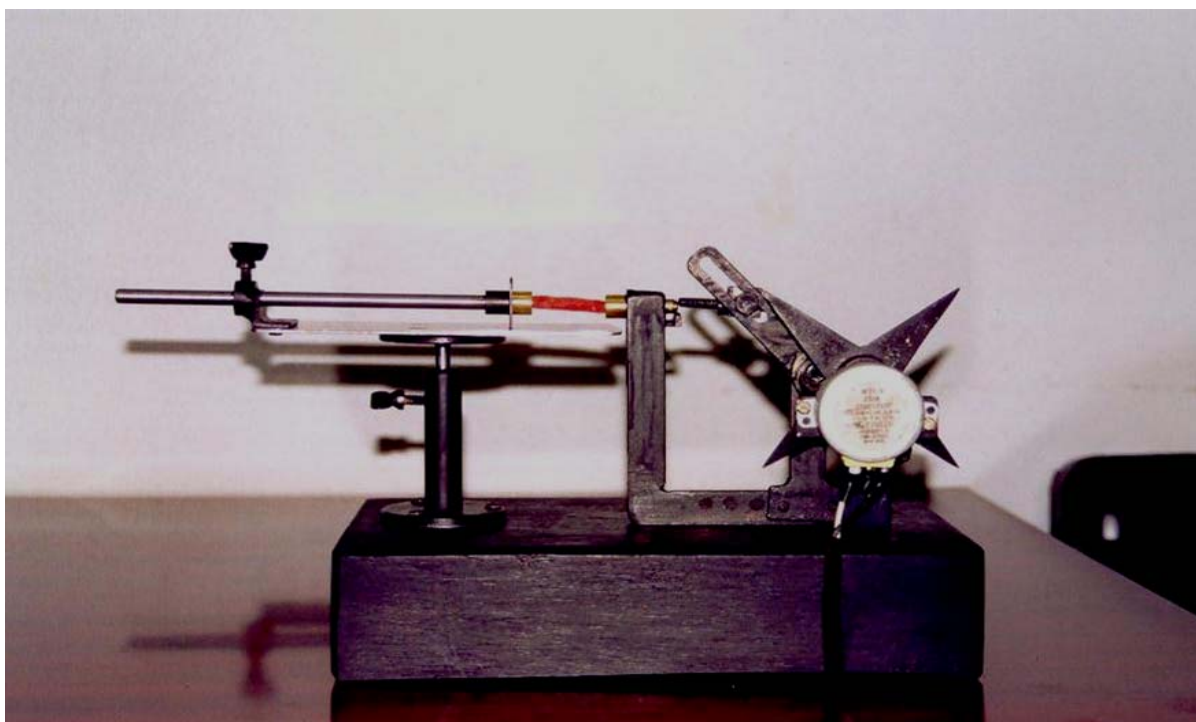


Figura 5: A máquina de carga compressiva repetitiva. Inicialmente a “estrela” utilizada na máquina tinha 4 pontas, e que foi substituída no experimento por uma de 6 pontas.

Inicialmente, o membro posterior direito do rato, era fixado em partes côncavas, que foram chamadas de copos fixadores (figuras 6, 7 e 8). Um dos copos era preso a uma haste fixada por um parafuso e que podia ser posicionada de acordo com o comprimento do membro testado. O outro copo estava colocado em

uma haste vertical central, o qual recebia a carga (impactos). O que recebia carga compressiva repetitiva era o copo que fixava o tornozelo do rato.

A carga compressiva era dada por uma peça de metal que foi denominada de martelo. Este martelo tinha, na porção média da sua haste, uma mola em espiral que o impulsionava de encontro a um dos copos. O martelo, por sua vez, era acionado a uma frequência determinada pelo giro no sentido anti-horário de uma “estrela”, que acionava a parte inferior do cabo do martelo, distal ao eixo de rotação. Esta estrela, originalmente, no teste inicial da máquina, possuía 4 pontas, porém, durante a realização do estudo piloto, foi substituída por uma de 6 pontas, devido à necessidade e a possibilidade de diminuir-se o tempo da coleta para quatro horas ao invés de seis de seis horas diárias, que era o tempo inicial.

Um motor elétrico dava o giro à cruzeta. A velocidade de giro do motor era de 3 voltas por minuto e, com a cruzeta de seis pontas, eram produzidos 18 impactos por minuto. Assim, foram necessários 6 minutos e 30 segundos diários de impactos em cada rato (os 117 impactos como média observada nas ginastas),

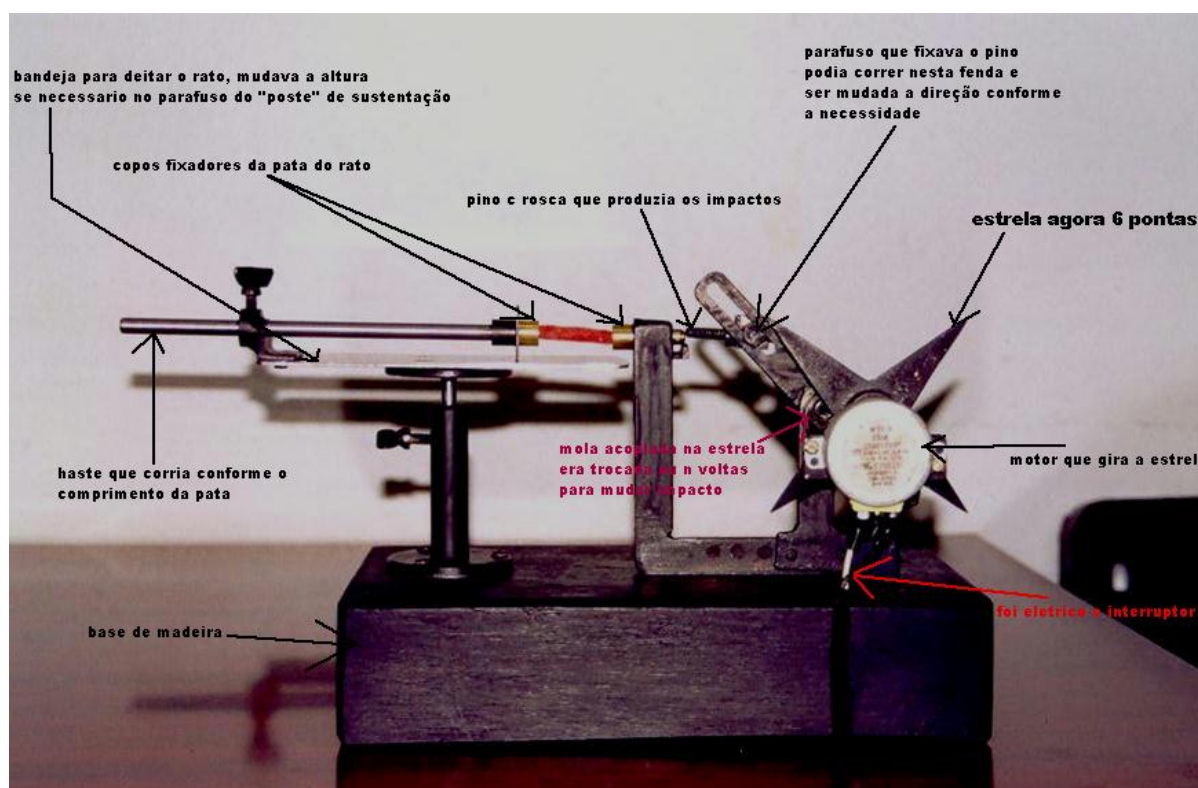


Figura 6: Foto da máquina com as peças nomeadas.

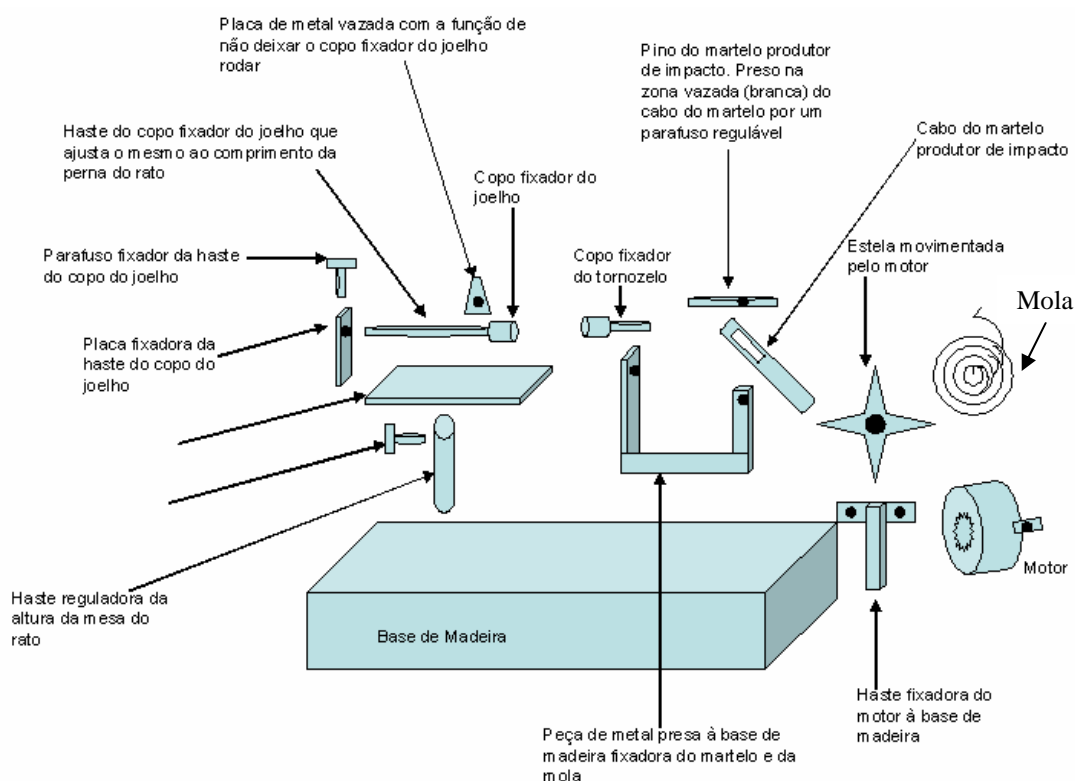


Figura 7: Desenho esquemático das partes que compõem a máquina de carga compressiva repetitiva, utilizada neste estudo.

5.4.2 - O Projeto Piloto para Teste da Máquina de Carga Compressiva

Um projeto piloto foi realizado com dois ratos para testar o funcionamento da máquina. O membro posterior direito dos ratos foi colocado nos copos fixadores, e aplicada a carga compressiva repetitiva durante 15 minutos para que fosse assegurada a eficácia do sistema. Não houve soltura de nenhum dos membros dos ratos testados na máquina possibilitando com que a máquina fosse calibrada e utilizada no experimento. As tíbias dos ratos foram retiradas após o teste, e uma análise preliminar não mostrou diferença no comprimento entre o membro testado e o contra-lateral com esta sessão única de carga.

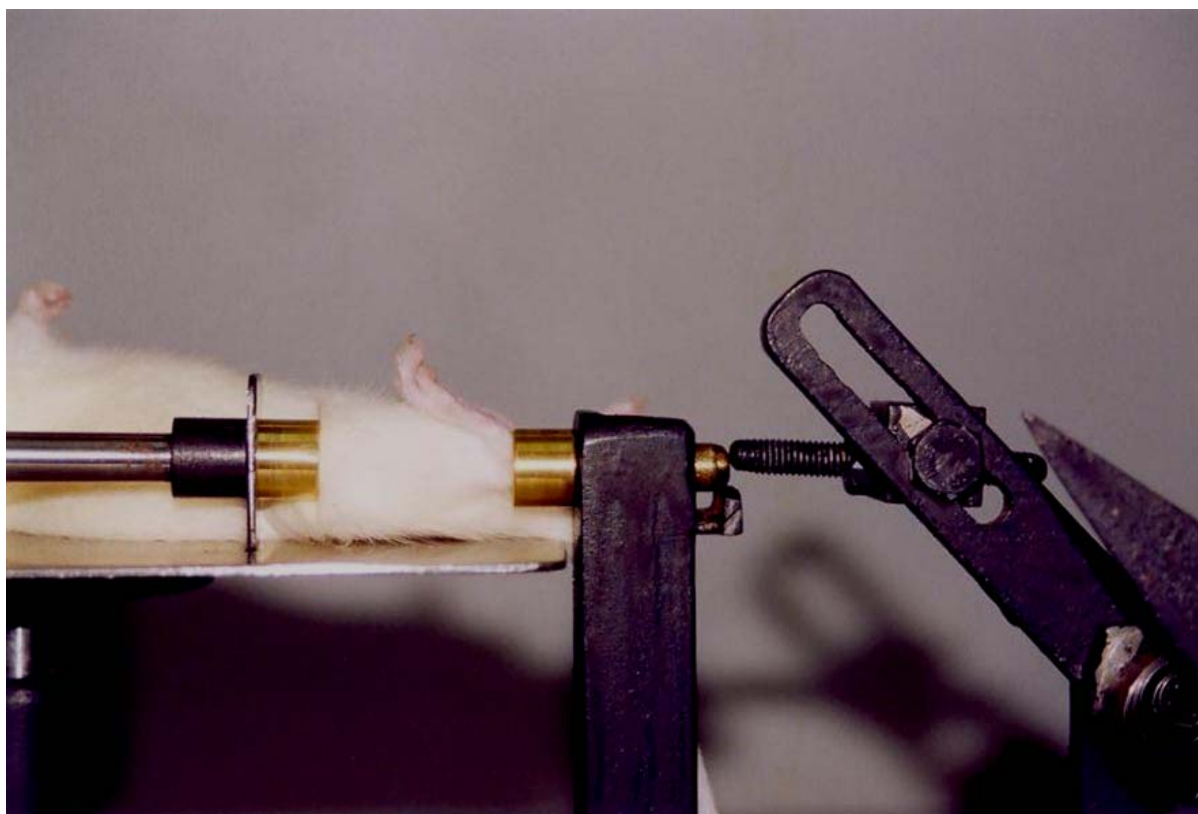


Figura 8: Detalhes do membro do rato fixado pelos copos fixadores e o martelo no momento de um impacto.

5.4.3 - Processo de Calibração da Máquina de Carga compressiva

O comprimento da mola propulsora do martelo, o seu número de voltas, e o passo de rosca do martelo eram os pontos de calibração da máquina. Inicialmente foram pesados 5 ratos do CREAL com a mesma idade mínima em dias, que os ratos da amostra do experimento possuíam, e 5 com a idade máxima dos ratos da amostra. Esta medida teve como objetivo estimar qual o limite mínimo e máximo, de peso, que poderiam ocorrer nos animais da amostra. Desta forma, poder-se-ia ter certeza que nenhum animal da amostra estaria fora das calibrações da máquina. Em outras palavras, estas medidas permitiram saber, quais as calibrações, mínima e máxima, seriam necessárias aplicar na amostra.

Definidos estes limites de peso e as calibrações da máquina, os ratos da amostra foram marcados com canetas coloridas na cauda e todos eles pesados diariamente, enquanto os impactos foram produzidos. O menor peso da amostra, no primeiro dia de impacto, foi de 52 gramas, e os animais ganhavam de 3 a 7 gramas diárias de peso (a tabela 1 mostra o exemplo de 4 ratos do grupo 5). O maior peso, no final do trabalho, foi de 160,5 gramas. Esta variação de peso entre os ratos foi um dos desafios do trabalho, pois para cada grama a mais de peso, teria que se disponibilizar uma mola diferente e, para que se pudesse resolvê-lo, foi necessário calibrar 8 molas, e aplicar os impactos por faixas a cada 8 gramas de peso de cada rato, como mostrado na tabela 2. Com isto, foram utilizadas 8 molas com capacidades diferentes de produção de impactos. Com a pesagem diária de cada rato, era possível saber qual faixa de carga aplicar no animal independentemente da diferença de peso exibida no mesmo grupo de mesma idade e, desta forma, diferentes magnitudes de cargas foram aplicadas nos ratos de um mesmo grupo para que se acompanhasse o parâmetro do seu peso.

Tabela 1: Exemplo das tomadas de peso e da sua variação nos ratos da amostra. Peso diário, em gramas, em 4 ratos do grupo 5. Os números em vermelho significam o início e o término da puberdade segundo proposto por Ojeda e Urbanski (citados por Castro e col, 2001)

Dia de impacto (dia de vida)	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4
1 (28)	69,50	61,00	56,50	58,50
2 (29)	75,00	66,00	60,00	63,00
3 (30)	77,50	70,00	63,50	68,00
4 (31)	84,50	76,00	68,50	64,50
5 (32)	91,50	83,50	74,50	80,00
6 (33)	97,00	89,00	80,00	84,50
7 (34)	102,50	94,50	86,00	90,00
8 (35)	108,50	99,50	91,00	94,50
9 (36)	112,00	105,00	96,50	99,00
10 (37)	117,00	109,00	103,50	102,50
11 (38)	125,00	113,50	108,50	108,50
12 (39)	128,50	119,00	114,50	113,00

Tabela 2: As molas utilizadas e a faixa de peso correspondente (a cada 8 gramas). Uma mola poderia ser utilizada em mais de uma faixa quando se conseguia a calibração mudando o número de voltas da mesma.

Mola	Faixa de Peso	Mola	Faixa de Peso
1	50 – 58	5	113 – 121
1	59 – 67	6	122 – 130
2	68 – 76	6	131 – 139
2	77 – 85	7	140 – 148
3	86 – 94	7	149 – 157
4	95 – 103	8	158 – 166
5	104 – 112		

5.4.4 - Determinação da Carga Compressiva

A primeira parte da determinação da carga compressiva consistiu em quantificar uma média de saltos observada em ginastas femininas, da equipe principal do Grêmio Náutico União, para ser utilizada na produção da carga em uma amostra animal com ratos, na terceira fase. Esta média foi de 117 saltos por sessão de treinamento, 5 vezes na semana. Para chegar a este número, foram observados os treinamentos de 5 atletas da equipe principal do clube durante 3 semanas. Foram escolhidos os saltos aonde os dois pés tocavam o solo ao mesmo tempo na sua fase final. Esta quantificação teve como objetivo aplicar, no modelo animal, um número de repetições da carga compressiva proporcional aos impactos sofridos realizado pelas ginastas, nos saltos escolhidos.

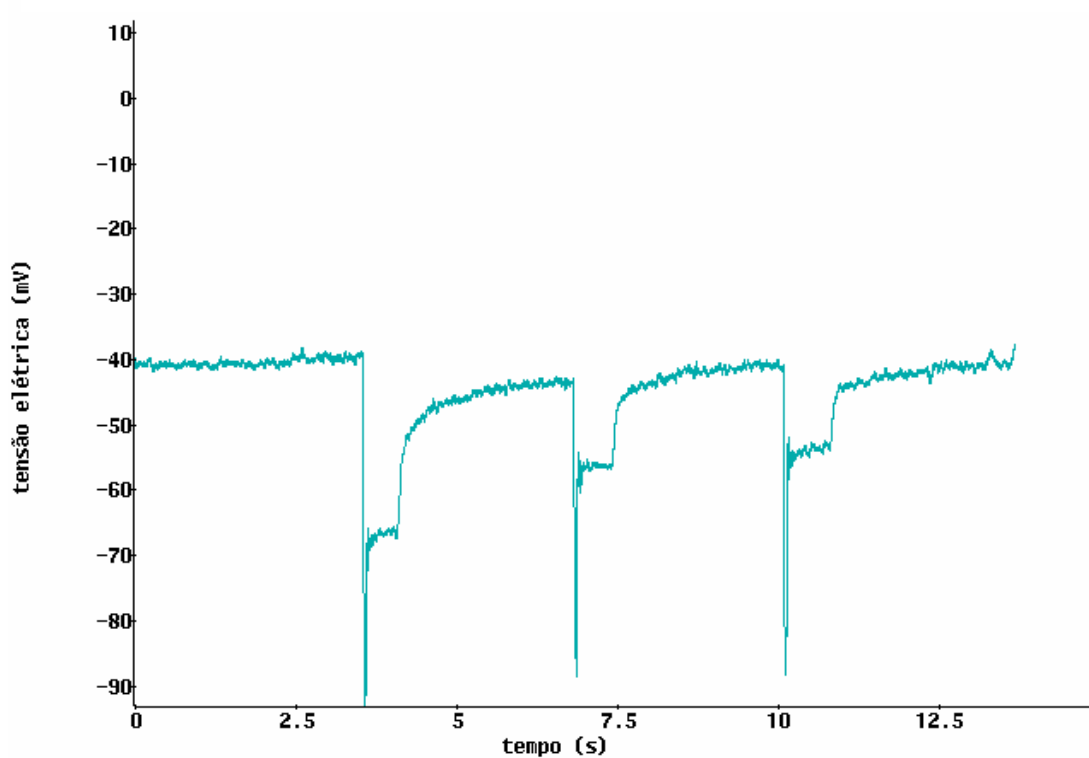
A magnitude da carga foi realizada utilizando-se uma célula de carga conectada a um condicionador para célula de carga, e este conectado a um computador (figura 9), onde se utilizou o sistema de aquisição de dados SAD32. O gráfico 1 mostra o sinal obtido no SAD32 em uma das calibrações da máquina. Eram realizados sempre 3 cargas compressivas para determinar se a magnitude seria uniforme. Este teste era repetido 3 vezes para se ter certeza da uniformidade dos picos na aquisição do sinal. No estudo não foi necessário um número maior que 3 picos, pois quando se testava com até 10 cargas compressivas, a resposta não mostrou ser diferente. No gráfico pode-se notar uma pequena discrepância entre o sinal da primeira cargas e os outros dois. Na transformação do sinal de mV para gramas, a diferença ficava dentro das faixas de peso a que foram divididos as cargas, com explicado na tabela 3.

A figura 10 mostra, com maior detalhe, o rato colocado na máquina e a célula de carga vistos de cima. A célula de carga utilizada no experimento possuía uma frequência natural de 580 Hz com sensibilidade de 2mV/V e carga máxima de 5Kgf. O tempo de impacto da carga medido no experimento foi de 50ms.

Como o sistema de aquisição, no computador, daria uma medida em milivolt, inicialmente foram utilizadas três porcas de massa conhecida (figura 11) para que se soubesse, em milivolt, que deformação essas porcas ocasionariam na célula de carga. Em seguida, acionado o sistema com o rato posicionado e a célula

conectada, mediu-se, em milivolt, a deformação que a carga compressiva gerou na célula e foi transformada em gramas, através de cálculo matemático chamado regra de três com a medida obtida com as três porcas.

Gráfico 1: Uma das aquisições dos dados, no SAD32, na calibragem da máquina de carga compressiva repetitiva.



Para que fossem calibradas as molas, elas foram cortadas em tamanhos diferentes, e o número de voltas de cada uma era mudado conforme a necessidade, tornando-as mais ou menos tensas e, conseqüentemente, maior ou menor

magnitude da carga. O outro ponto de calibração, que era o passo de rosca do martelo não foi utilizado, pois se conseguiram as calibrações necessárias com as molas. O processo de calibração ocorreu da mesma forma para todos os 6 grupos da amostra.

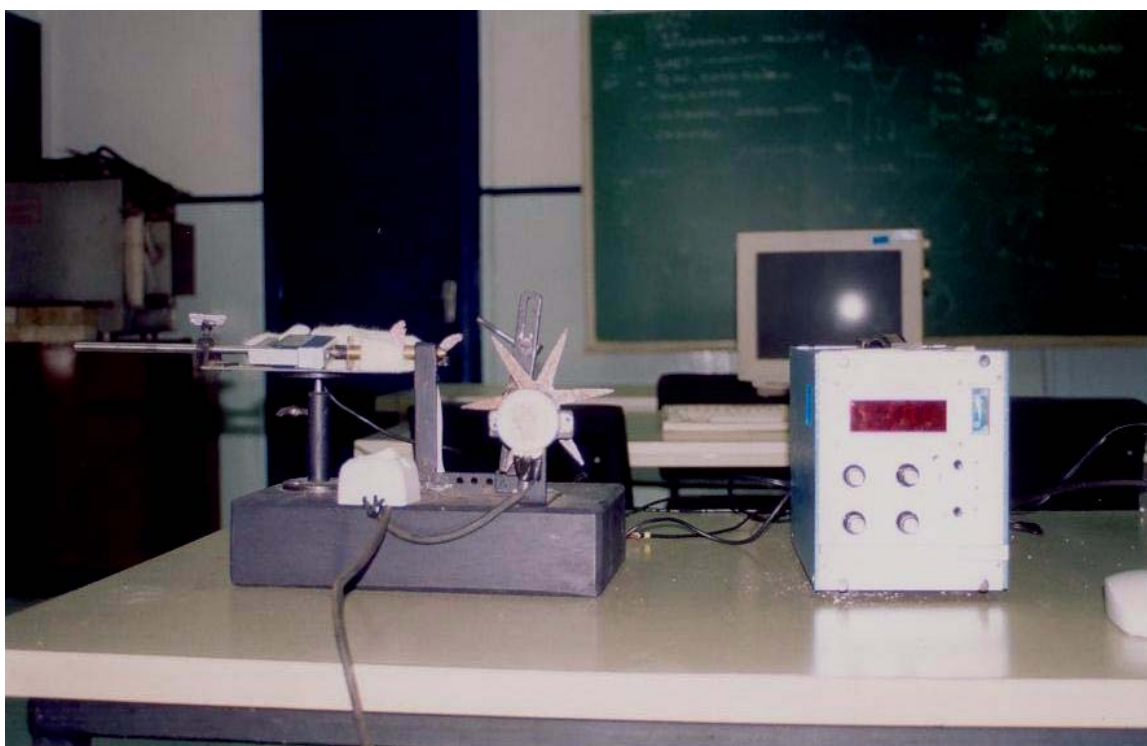


Figura 9: Foto da máquina de carga com a célula de carga conectada ao condicionador e ao computador

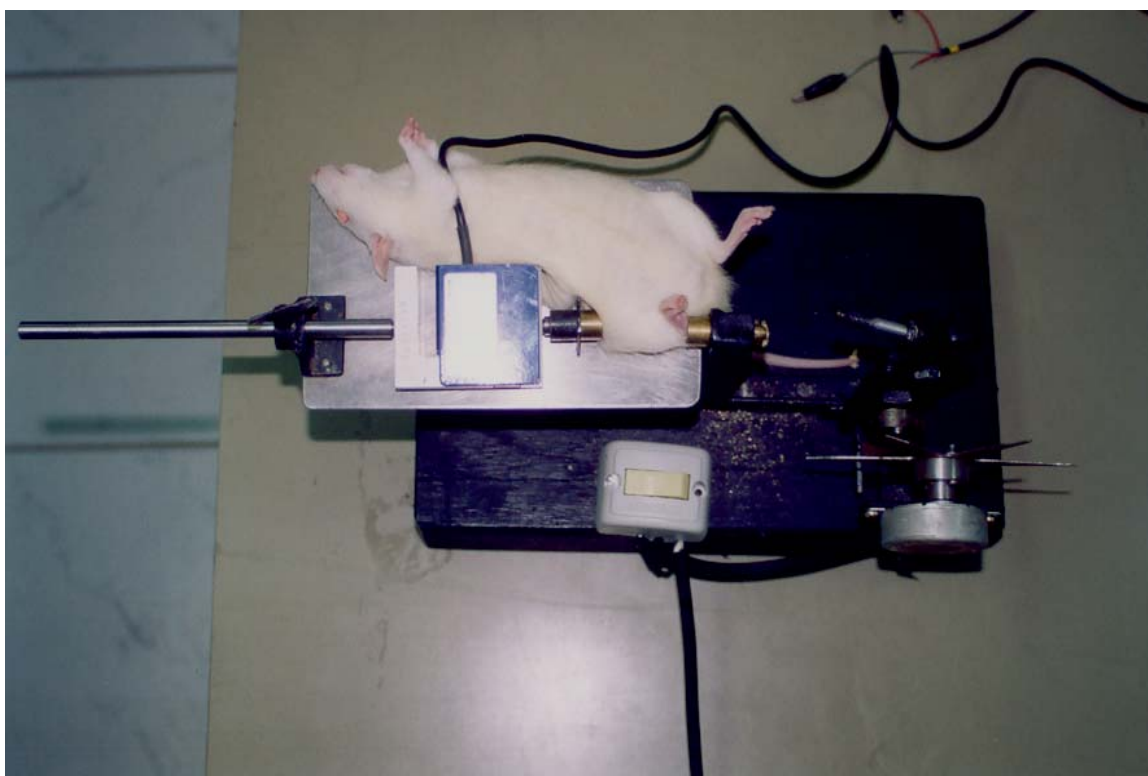


Figura 10: Foto com detalhe do rato na máquina e a célula de carga vista de cima

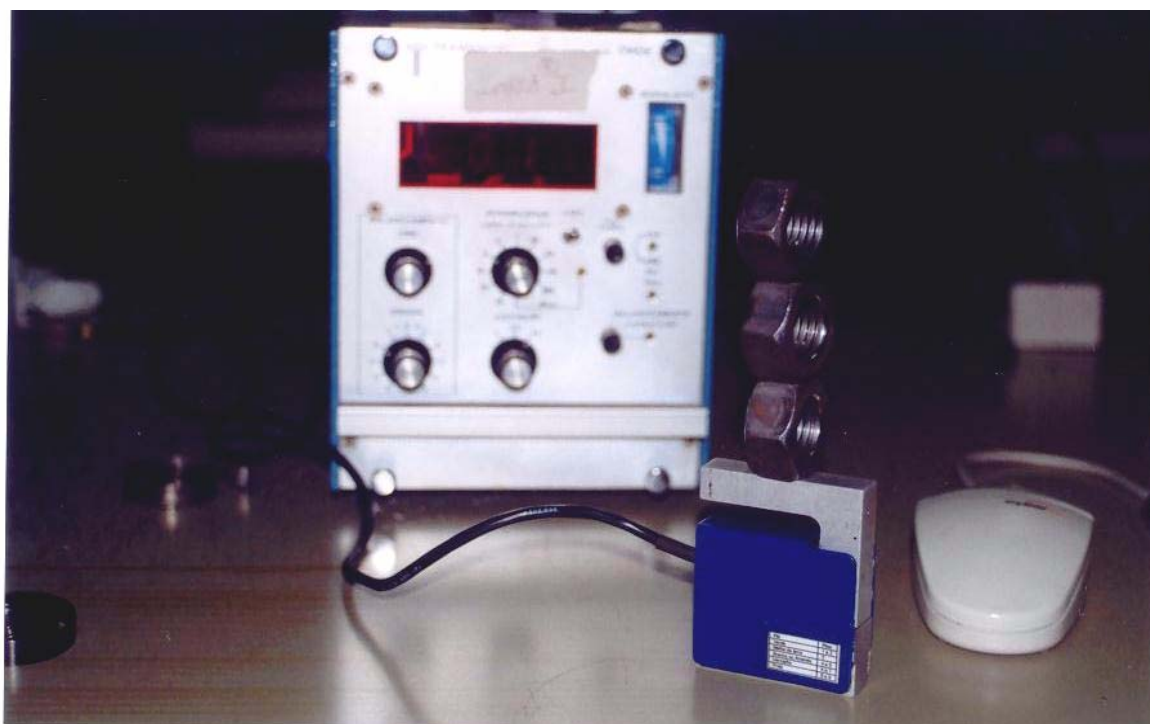


Figura 11: Inicialmente era medida a deformação que uma massa conhecida causava na célula de carga e o que esta deformação representava em mV.

5.4.5 - Os Procedimentos de Coleta de Dados

Inicialmente foram feitos papéis com numeração de um a seis, e dobrados para que o número não ficasse exposto e fosse realizado sorteio para determinar o grupo de cada animal. Desta forma, cada rato era escolhido ao acaso a que grupo pertenceria. Da mesma forma, dentro de cada grupo, foi realizado um sorteio para determinar o número de cada rato. Assim tentou-se garantir maior independência nos resultados do experimento.

O objetivo do projeto foi utilizar uma magnitude de carga compressiva de 3,5 vezes o peso de cada animal da amostra para mimetizar os dados coletados por Dyhre-Poulsen (1987) em atletas de ginástica no momento de um salto (salto denominado de split leaps).

A reprodutibilidade de cada calibração realizada mostrou uma pequena variação de magnitude das cargas, que ficava ao redor de 3,5 vezes o peso do rato, e não exatamente neste número. Devido a esta variação obtida nas calibrações e às características das molas utilizadas na máquina para impulsionar o martelo produtor da carga (impactos), foi necessário aplicar a carga nos ratos, por faixas de peso (tabela 2). Cada calibração foi repetida 9 vezes até se determinar o comprimento de cada mola e o número de voltas necessário para cada carga.

5.4.6 - Preparação da Amostra e os Procedimentos do Estudo

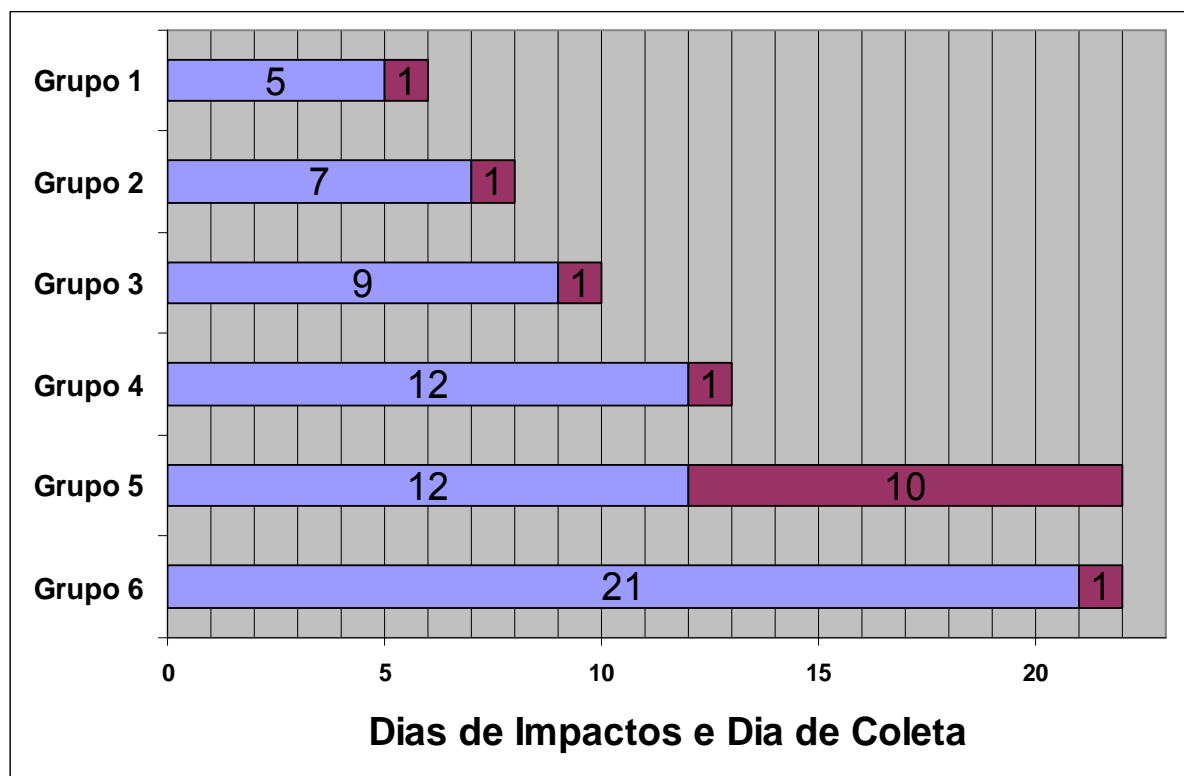
Os ratos foram anestesiados diariamente, quando testados, com injeção intra-peritoneal de 10mg/kg de Ketamina (Ketamina Agener 10%, Agener União, União Química Farmacêutica Nacional S/A) e 50mg/kg de Xilazina (Anasedan, Agribrands do Brasil LTDA). Não foram encontrados, na literatura, dados que mostrassem danos às placas de crescimento com este procedimento anestésico. Em seguida foram utilizadas canetas coloridas para marcar os ratos (as caudas eram

pintadas) e a cor utilizada no rato era a mesma em todo o experimento dentro de cada grupo. Após esse procedimento, os ratos eram pesados e esta medida era anotada em uma tabela que continha o número do rato, a sua cor e o grupo correspondente.

A seguir, o animal era colocado na máquina de carga e os copos fixadores eram ajustados ao comprimento do membro posterior (inferior) direito do animal (figura 8). O tornozelo ficava no copo correspondente com uma flexão dorsal de aproximadamente 120 graus e o joelho, no seu copo fixador, com uma flexão de aproximadamente 120 graus também (figura 8). A posição de partida do martelo era definida e foi utilizada a mesma para todos os ratos, a fim de se aplicar o mesmo número de cargas em toda a amostra. Um cronômetro era disparado juntamente com o acionamento da máquina. Quando o tempo determinado no cronômetro, de 6 minutos e trinta segundos, terminava, um alarme indicava o momento de desligar a máquina e o rato era colocado novamente na sua gaiola. Os animais acordavam em torno de 30 a 50 minutos após a anestesia, e a sua movimentação era livre.

A carga compressiva repetitiva foi aplicada diariamente aos grupos de ratos pré-púberes, em um dos membros inferiores (direito), sendo o contra-lateral o seu controle. O sacrifício dos ratos e a coleta da tíbia foram no dia seguinte ao término dos impactos. Os impactos foram aplicados, inicialmente, no quarto dia precedente ao início da puberdade para todos os grupos, ou seja, 28 dias de vida. O período de aplicação da carga e os dias de coleta são mostrados no gráfico abaixo (gráfico 2).

Gráfico 2: Colunas mostrando os 6 grupos de ratos. Os números dentro das colunas correspondem aos números de dias de carga a que cada grupo foi submetido. O ponto zero de impactos, no eixo X, indica 28 dias de vida. As partes em bordô representam quantos dias após o término da aplicação da carga, as tíbias foram coletadas.



As cargas compressivas repetitivas no grupo 1 foram aplicadas até o primeiro dia da puberdade (cinco dias de carga); para o grupo 2, até o terceiro dia da puberdade (7 dias de carga); para o grupo 3, até o quinto dia de puberdade (9 dias de carga); para o grupo 4, até o final da puberdade; para o grupo 5, até o final da puberdade e, para o grupo 6, até nove dias após o término da puberdade.

No dia seguinte ao término da aplicação da carga compressiva em cada grupo, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e as tíbias direita e esquerda foram retiradas, e todos os tecidos moles ao seu redor foram dissecados. A exceção ficou para o grupo 5, onde o sacrifício e a retirada das tíbias ocorreu no décimo dia após o término da aplicação da carga, já que as observações clínicas, em ginastas, sugerem uma compensação no crescimento após o término das cargas compressivas repetitivas (Damsgaard e col., 2000) e, em ratos, 1 semana após os experimentos (Ohashi e col., 2002).

As tíbias dissecadas dos tecidos moles (figura 12 e 13) foram colocadas em

frascos de plástico, contendo formol a 10%, e esses frascos eram etiquetados com o número de cada rato e o grupo ao qual pertenciam. Em seguida, essas coletas foram levadas até o Laboratório de Pesquisa em Patologia do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o seu processamento.



Figura 12: Foto mostrando a tíbia direita de um dos ratos após a retirada e a ressecção dos tecidos moles a ela inseridos.



Figura 13: Foto mostrando a tíbia esquerda de um dos ratos após a retirada e a ressecção dos tecidos moles a ela inseridos.

O próximo procedimento utilizado foi a descalcificação das tíbias em ácido nítrico a 7%, colocadas em blocos de parafina para que fossem realizados cortes no plano sagital com 5µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, de acordo com estudos da literatura (Rodriguez e col., 1992), e analisadas em seguida por um patologista. O patologista recebia as lâminas sem o grupo ou o número dos ratos. Nas mesmas foram colocados códigos correspondentes aos grupos e o número de cada animal no grupo, para que as análises fossem cegas. As medidas foram realizadas em milímetros com o auxílio de uma lente onde existia uma régua impressa. Para se medir a espessura da placa, a espessura da zona de repouso, da zona de proliferação e das zonas hipertróficas e de calcificação, foi utilizado microscópio ótico com uma lente com aumento de 40 vezes para a espessura total da placa, com aumento de 100 vezes para as medições das zonas da placa e com aumento de 400 vezes para a contagem do número de células da zona de proliferação. As figuras 14, 15 e 16 mostram microfotografias das lâminas da placa de crescimento. A figura 14 mostra uma foto da placa de crescimento, com 40 vezes de aumento, onde pode-se ver a zona de repouso e em seguida a zona proliferativa com suas colunas e a típica formação das células “ em pilha de moedas” . Em seguida, nota-se claramente a transição para a zona hipertrófica, mais clara, e que a sua característica principal é a relação núcleo citoplasma. Há um aumento marcante do citoplasma celular que indica o evento inicial da calcificação que virá em seguida, na zona de calcificação.

A figura 15 mostra a fotografia com aumento de 100 vezes, mostrando um detalhe da transição entre as zonas de proliferação, hipertrófica e de calcificação.

Na figura 16 vê-se uma fotografia, com aumento de 100 vezes, das zonas de hipertrofia e de calcificação. Nota-se que na transição da zona de proliferação para a zona hipertrófica, esta ainda exibe um certo arranjo em colunas, nas suas células. Já existe uma mudança evidente na relação núcleo/ citoplasma e uma diminuição da matriz ao redor das células, consequência da hipertrofia celular. A seta mostra uma coluna da zona de proliferação. Abaixo da zona de calcificação já aparece a metáfise óssea onde a primeira camada é chamada de esponjosa primária.

Sabe-se que a taxa de crescimento óssea pode ser descrita como o

resultado de dois processos na placa de crescimento; proliferação e hipertrofia dos condrócitos, e que a divisão celular ocorre na zona proliferativa. Segundo Vanky e col (2000), no rato normal, a altura da cada coluna, na zona de proliferação, é de aproximadamente 18,0 condrócitos. Por isso, neste estudo, foi realizada a contagem do número de células das colunas na zona proliferativa. Foram escolhidas 3 colunas e realizada a contagem para se atingir um número médio destas células. Não foram medidas as espessuras da zona hipertrófica e de calcificação separadamente, pois as colorações das lâminas, utilizadas neste estudo, impunham uma dificuldade em separar com precisão estas duas zonas. Desta maneira, as duas zonas foram medidas conjuntamente.

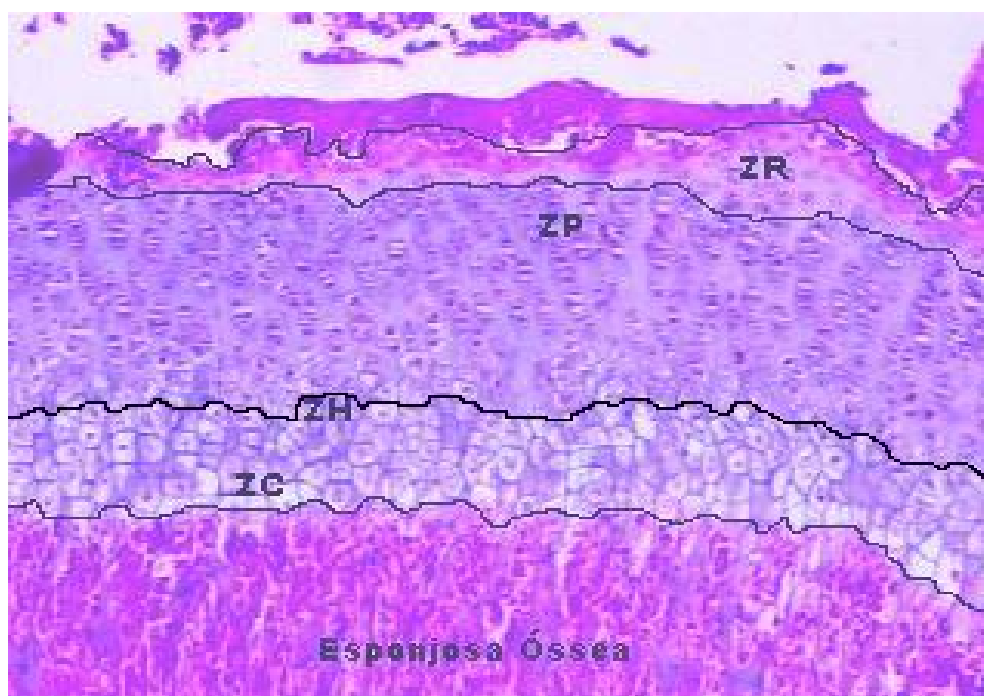


Figura 14: Fotografia da placa de crescimento, com 40 vezes de aumento, de um dos ratos da amostra, da tíbia esquerda, do grupo 1, onde ZR representa a zona de repouso, ZP, a zona proliferativa; ZH, a zona hipertrófica e ZC a zona de calcificação. Abaixo da placa inicia a metáfise onde pode-se ver a esponjosa óssea

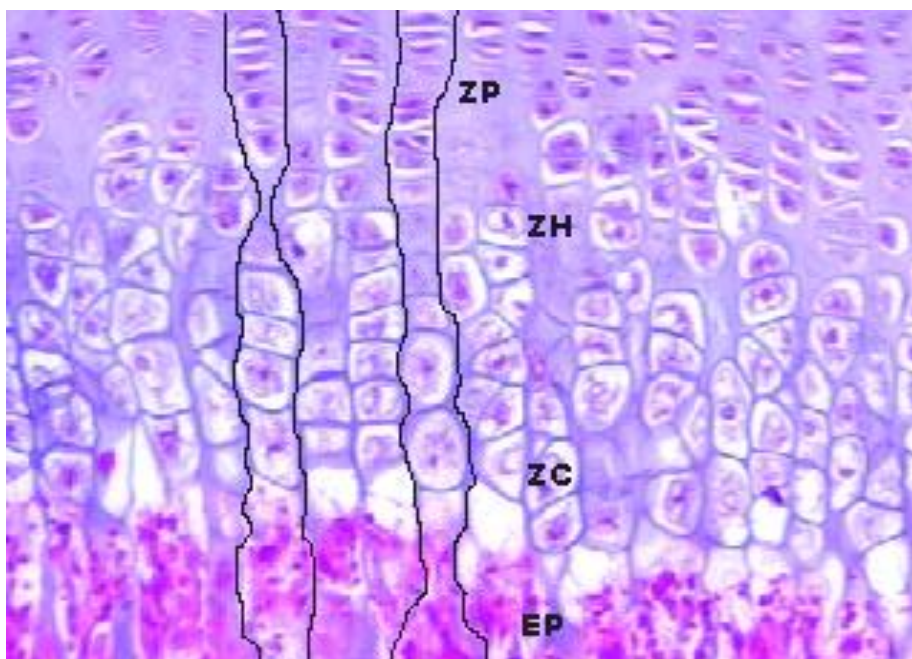


Figura 15: Fotografia da placa de crescimento com detalhe de 100 vezes de aumento, transição entre as zonas proliferativa, hipertrófica e de calcificação. As linhas mostram duas colunas, na zona proliferativa, e o seguimento nas camadas abaixo. ZP representa a zona proliferativa, ZH, a zona hipertrófica e ZC, a zona de calcificação.

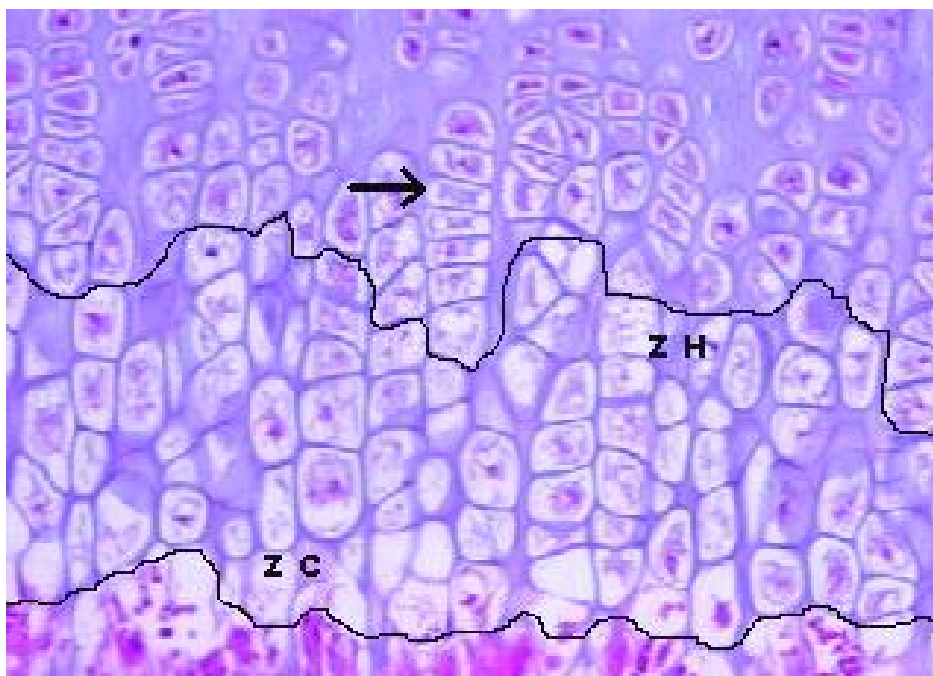


Figura 16. Fotografia mostrando em detalhe as zonas de hipertrofia e de calcificação com aumento de 100X. Nota-se uma mudança da relação entre o núcleo e o citoplasma, comparadas com a zona de proliferação, evento inicial da calcificação. Também existe uma diminuição da matriz nestas zonas, comparadas com a zona proliferativa. A seta mostra uma coluna da zona proliferativa.

5.5 – Análise Estatística

Para realizar as comparações intra-grupo, entre a tíbia do lado direito e a do lado esquerdo, foi realizado o Teste t para amostras pareadas, e para as comparações inter-grupo foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). O Teste de Duncan foi utilizado para as comparações múltiplas da análise de variância a fim de identificar as diferenças obtidas pela ANOVA.

Os resultados foram expressos em médias e desvios padrão.

O nível de significância adotado foi de 5%.

Os cálculos foram realizados no programa SPSS 10.0 ,Standard Version, (SPSS Inc),

6 - RESULTADOS

Todos os resultados foram expressos como a média e desvio padrão obtidos para os seis grupos da amostra e podem ser visualizados nos gráficos 3, 4, 5, 6 7 e 8.

6.1 – Análises comparativas entre a tibia direita e esquerda nos seis grupos

Comprimento total e espessura da placa de crescimento da tibia:

Com relação à análise dos resultados obtidos para as medidas do comprimento total da tibia direita e esquerda para os grupos 3, 4 e 5, as diferenças entre as médias foram estatisticamente significativas. Quando analisamos as médias em cada um dos grupos, comparando a tibia direita (submetida às compressões) com a tibia esquerda (controle), observou-se que, nestes três grupos, a tibia direita era mais curta que a esquerda (gráfico 3).

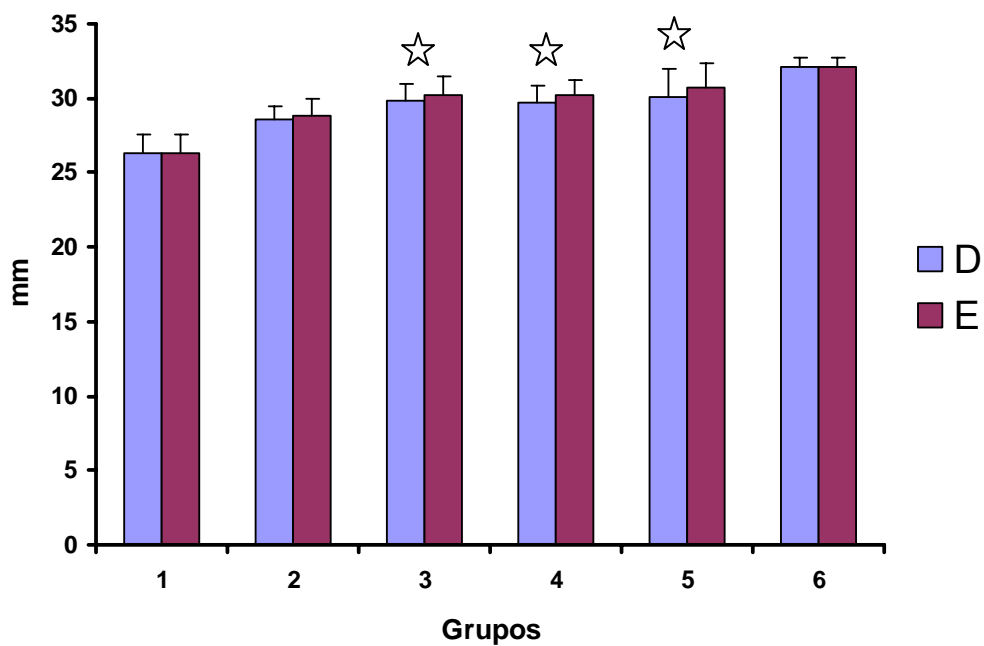
Nas análises de variância entre os grupos, as tibias direita e esquerda mostraram diferença significativa entre os grupos. O grupo 6 apresentou o maior comprimento médio de todos os grupos, e o grupo 1 apresentou o menor comprimento, tanto na tibia direita como na tibia esquerda. Isso já era esperado, visto que os ratos mais velhos se encontram no grupo 6.

Também foram significativas as diferenças entre as espessuras da placa de crescimento na tibia dos ratos dos grupos 3, 4, 5 e 6 quando realizados os testes pareados dentro de cada grupo (gráfico 4). A espessura da placa de crescimento na pata esquerda (sem carga compressiva) foi maior que a direita (com carga compressiva).

Na comparação entre os grupos, as diferenças foram estatisticamente significativas para a espessura total da placa de crescimento apenas na tibia direita (submetida às compressões) apresentando uma espessura maior no grupo 1.

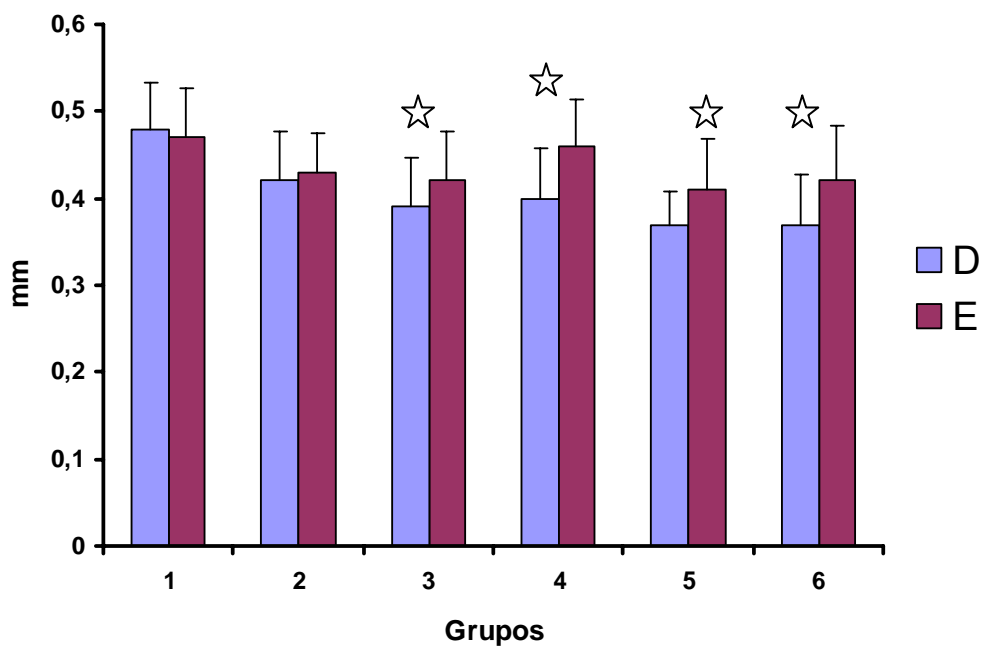
A tabela 13 do anexo 2, correspondente aos gráficos 3 e 4, respectivamente, mostra estes valores em média e desvio padrão.

Gráfico 3: Média do comprimento total das tíbias e seus desvios padrão nos seis grupos. A letra D corresponde a tibia direita dos ratos e a letra E a tibia esquerda.



* D<E, p<0,05

Gráfico 4: Médias e desvios padrão da espessura total da placa de crescimento, nos seis grupos. A letra D representa a tibia direita e a letra E a tibia esquerda.



* D<E, p<0,05

Espessura da zona de repouso e da zona proliferativa da placa de crescimento:

O gráfico 5 mostra as diferenças na espessura da zona de repouso entre a tibia direita e a tibia esquerda. Os resultados mostraram diferenças significativas para os grupos amostrais 4, 5 e 6, manifestando que no lado direito esta zona era significativamente menor.

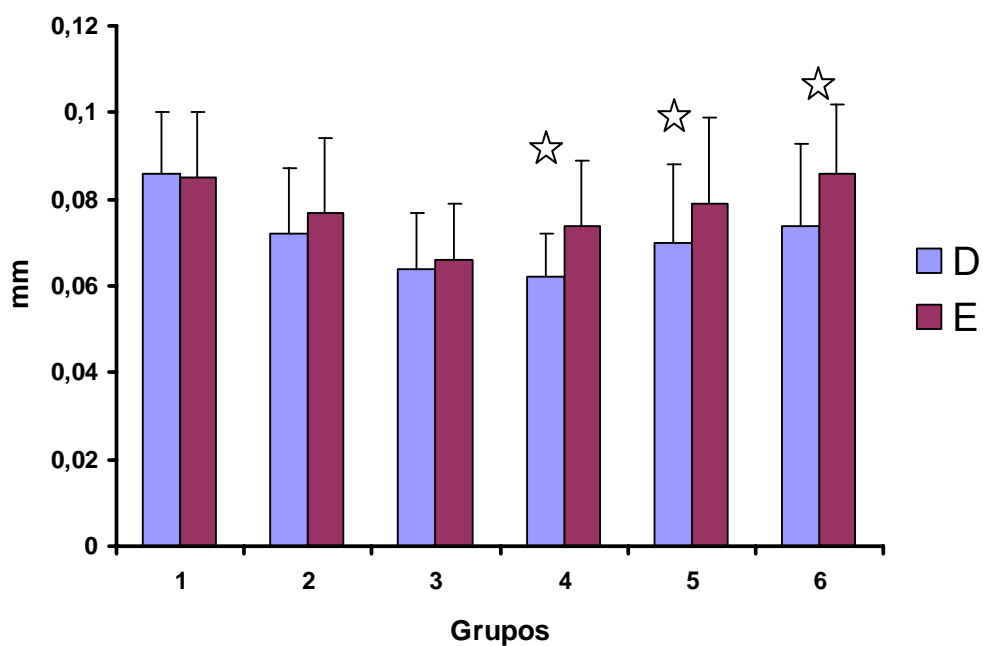
Na comparação entre os grupos, houve diferença significativa na tibia direita e não na tibia controle, diferenciando o grupo 1 dos grupos 5, 3 e 4, que apresenta a maior espessura da zona de repouso.

Foram significativas as diferenças nos resultados da espessura da zona proliferativa entre a tibia direita e a tibia esquerda para os grupos 3, 4, 5 e 6 (gráfico 6). A espessura da zona proliferativa foi mais curta na pata direita. A zona proliferativa foi menor nestes grupos expressando um possível efeito das cargas compressivas, em relação com o tempo.

Nas comparações entre os grupos, os resultados obtidos também apresentaram valores estatisticamente significativos para a espessura da zona de repouso e para a espessura da zona proliferativa, ambas na tibia direita. O teste de Duncan mostrou que o grupo 1 foi diferente dos demais para a zona de repouso e a proliferativa.

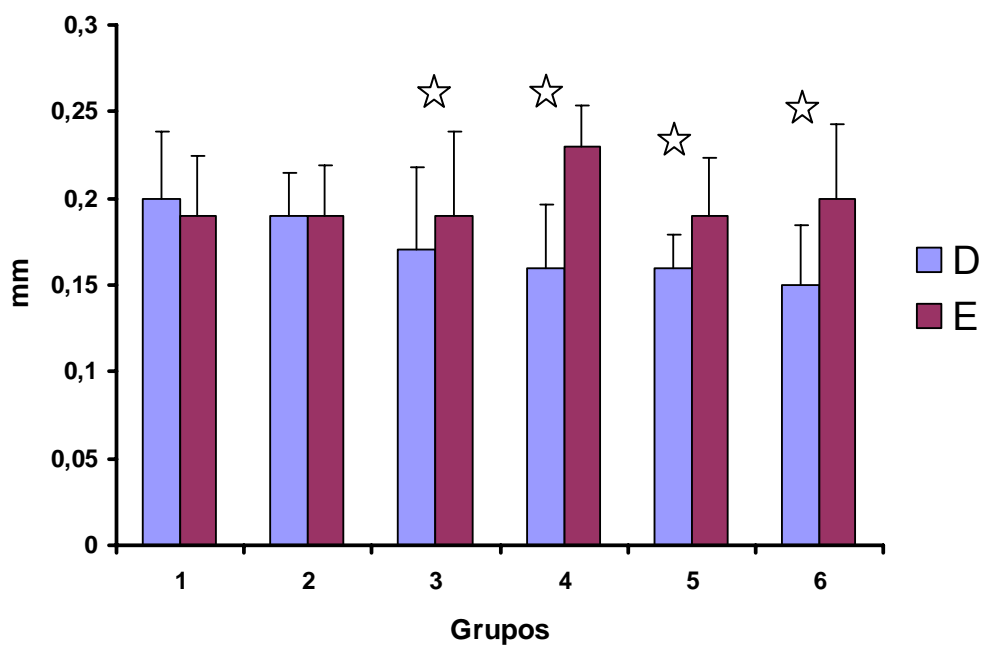
A tabela 14, do anexo 2, correspondente aos gráficos 5 e 6, respectivamente, mostra os resultados em média e desvio padrão.

Gráfico 5: Médias e desvios padrão da espessura da zona de repouso, nos seis grupos. A letra D representa a tíbia direita e a letra E a tíbia esquerda.



* D<E, p<0,05

Gráfico 6: Médias e desvios padrão da espessura da zona proliferativa, nos seis grupos. A letra D representa a tíbia direita e a letra E a tíbia esquerda.



* D<E, p<0,05

Número de células da zona proliferativa da placa e espessuras das zonas hipertrófica e de calcificação da placa:

Conforme o gráfico 7, o número de células da zona proliferativa entre a tíbia direita e a tíbia esquerda apresentou diferenças significativas nos grupos 2, 3, 4, 5 e 6. Excetuando-se o grupo 2, nos outros grupos, o número médio de células por colunas foi menor na tíbia direita.

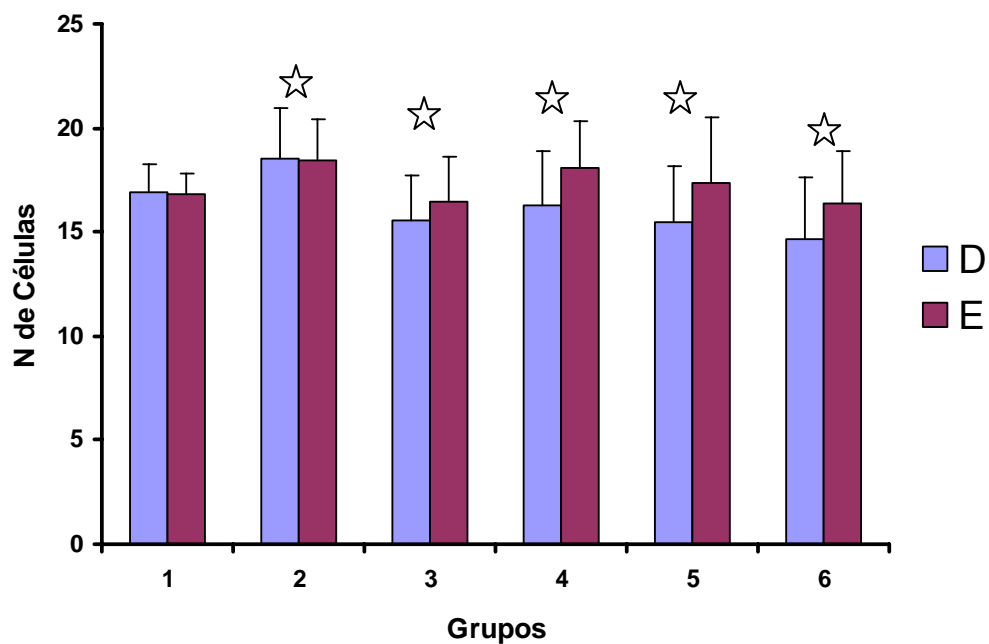
Com relação à comparação entre os grupos, o número de células da zona proliferativa na tíbia direita, apresentou diferenças significativas. Os grupos 3, 5 e 6 foram diferentes do grupo 1, sendo este último o que apresentou o maior valor médio na tíbia direita.

Analisando-se as espessuras das zonas hipertróficas e de calcificação nas tíbias direitas e nas tíbias esquerdas, os resultados foram semelhantes dentro de um mesmo grupo (gráfico 8).

A tabela 15 do anexo 2 mostra os valores em média e desvio padrão.

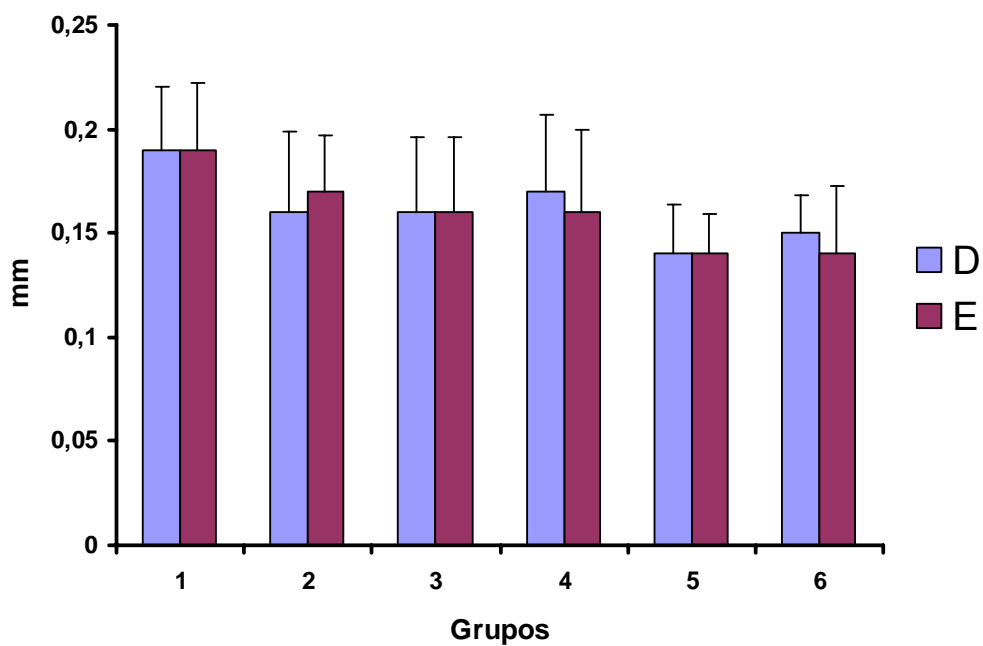
A descrição completa das medidas do comprimento da tíbia, das espessuras das zonas e do número médio de células na zona proliferativa da placa de crescimento, consultar as tabelas nº 7, 8, 9, 10, 11, 12, no anexo 1.

Gráfico 7: Médias e desvios padrão do número médio de células nas colunas da zona proliferativa. A letra D representa a tíbia direita e a letra E a esquerda.



* D<E, $p < 0,05$

Gráfico 8: Médias e desvios padrão da espessura das zonas hipertrófica e de calcificação, nos seis grupos da amostra. A letra D representa a tíbia direita e a letra E a tíbia esquerda.



6.2 – Análises de comparações múltiplas entre os seis grupos

Foram realizadas, análises de comparações múltiplas com o teste de Duncan para aquelas variáveis que apresentaram diferenças estatísticas entre as médias, nos teste F, e mostradas nas tabelas abaixo.

Tabela 3: Médias das análises de comparações múltiplas do comprimento da tíbia direita e esquerda, em milímetros. As letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Duncan.

Comprimento total da tíbia direita		Comprimento total da tíbia esquerda	
Grupo	Médias	Grupo	Médias
6	32,090 ^a	6	32,050 ^a
5	30,060 ^b	5	30,780 ^b
4	29,830 ^b	4	30,270 ^b
3	29,830 ^b	3	30,270 ^b
2	28,530 ^c	2	28,800 ^c
1	26,260 ^d	1	26,280 ^d

Os números da tabela acima (tabela 3) mostram que 3 grupos não diferiram em relação ao comprimento da tíbia, do lado direito, o mesmo encontrado no lado esquerdo.

Tabela 4: Médias das análises de comparações múltiplas da espessura da placa de crescimento e da espessura da zona de repouso na tíbia direita. As letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Duncan

Espessura da placa de crescimento na tíbia direita		Espessura da zona de repouso na tíbia direita	
Grupo	Médias	Grupo	Médias
1	0,477 ^a	1	0,086 ^a
2	0,418 ^b	6	0,074 ^{ab}
4	0,396 ^b	2	0,072 ^{ab}
3	0,394 ^b	5	0,070 ^b
5	0,371 ^b	3	0,064 ^b
6	0,369 ^b	4	0,062 ^b

Na tabela 4, observa-se que cinco grupos não diferiram na análise múltipla entre os grupos, para a tíbia direita, na espessura da placa. Apenas o grupo 1 foi diferente. Para a espessura da zona de repouso, também o grupo 1 foi diferente dos demais, na tíbia direita.

Tabela 5: Médias das análises de comparações múltiplas da espessura da zona proliferativa e do número médio de células nas colunas da zona proliferativa na tíbia direita. As letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Duncan

Espessura da zona proliferativa na tíbia direita		Número médio de células nas colunas da zona proliferativa na tíbia direita	
Grupo	Médias	Grupo	Médias
1	0,199 ^a	2	18,50 ^a
2	0,186 ^{ab}	1	16,90 ^{ab}
3	0,173 ^{ab}	4	16,30 ^{ab}
4	0,163 ^b	3	15,60 ^b
5	0,157 ^b	5	15,44 ^b
6	0,154 ^b	6	14,70 ^b

Na tabela 5, os dados mostram que existiu diferença, também no grupo 1 para a espessura da zona proliferativa da tibia direita. Para a análise do número médio de células das colunas da zona hipertrófica, da tibia direita não houve diferença entre os grupos 2, 1 e 4 quando comparados entre eles, e entre os grupos 1, 4, 3, 5 e 6 quando comparados entre eles.

Tabela 6: Médias das análises de comparações múltiplas da espessura das zonas hipertrófica e de calcificação nas tíbias direita e esquerda. As letras iguais não diferem pelo teste de Duncan

Espessura da zona hipertrófica e de calcificação na tibia direita		Espessura da zona hipertrófica e de calcificação na tibia esquerda	
Grupo	Médias	Grupo	Médias
1	0,190 ^a	1	0,1922 ^a
4	0,171 ^{ab}	2	0,1656 ^{ab}
2	0,160 ^{ab}	3	0,1590 ^b
3	0,157 ^b	4	0,01580 ^b
6	0,149 ^b	6	0,1433 ^b
5	0,144 ^b	5	0,1430 ^b

Na tabela 6, quando comparamos as médias entre os grupos, nota-se que os grupos 1, 4 e 2 não apresentaram diferenças entre eles, para a espessura das zonas hipertróficas e de calcificação na tibia direita porém, eles foram diferentes dos grupos 3, 6 e 5 (o 4 e o 2 também não foram diferentes do 3, 5 e 6), que foram iguais entre si. Na tibia esquerda, os grupos 1 e 2 não diferiram, no teste de Duncan, e os grupos 2, 3, 4, 6 e 5 foram semelhantes.

7 - DISCUSSÃO

Estudos têm sido publicados para tentar entender o efeito de forças da atividade física e forças compressivas e repetitivas sobre os ossos (Carter, 1980; Golding., 1994; Turner, 1995; Judex e col., 2000).

Existem especulações, na literatura, de que o exercício pode influenciar o crescimento ósseo (Damsgaard, 2000; Schnirring, 2001). No exercício, muitos fatores podem influenciar o desenvolvimento ósseo e um deles pode ser o impacto repetitivo como o aplicado neste estudo. O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito da compressão dinâmica, em uma amostra de ratos, no crescimento longitudinal da placa de crescimento proximal da tíbia. Os resultados deste experimento indicaram que o crescimento da tíbia pode ser diminuído, aplicando-se cargas compressivas repetitivas com magnitudes de aproximadamente 3,5 vezes a massa corporal. Esta magnitude foi aumentada com o aumento da massa corporal dos animais da amostra, a fim de acompanhar esta proporção de 3,5 vezes.

Estas cargas compressivas repetitivas poderiam afetar negativamente o crescimento ósseo com uma ação mecânica direta sobre a placa de crescimento. Especulações sobre estes efeitos mecânicos têm sido levantadas em ginastas com a observação da possibilidade de fechamento precoce da placa de crescimento distal do rádio, com um conseqüente aumento do comprimento da ulna em relação ao rádio. Beunen e col. (1997) sugerem que ginastas com maturidade esquelética avançada em relação à idade cronológica, tendem a apresentar uma variação positiva da ulna em relação ao rádio. Porém, não existem evidências mostrando que o fechamento precoce da placa distal do rádio seja realmente prematuro.

Este estudo utilizou a magnitude de aproximadamente 3,5 vezes a massa corporal dos ratos. Esta magnitude foi utilizada por ser próxima às medidas encontradas na literatura em ginastas. Mesmo com dados de ossos diferentes, os números são aproximados em relação às cargas compressivas medidas nos membros superiores e inferiores dos ginastas. Elas são especificamente de até 3 vezes a massa corporal, no punho de ginastas masculinos (Markolf e col., 1994) e de 3,5 vezes, encontrada no salto “splits leaps” em ginastas femininas (Dyhre-Poulsen, 1987).

Robling e col. (2001) observaram que cargas axiais causam mudanças histomorfométricas na placa de crescimento distal da ulna, mas não na placa proximal, sugerindo que os efeitos das cargas estão mais concentrados na metáfise distal. Neste aspecto, sabe-se que, no membro superior ou dianteiro, o crescimento maior acontece na placa distal do rádio e ulna e proximal do úmero. No presente estudo, foram estudadas as mudanças na placa proximal da tíbia, e não na placa distal deste osso. A possível concentração dos efeitos das cargas na placa distal seria menor na tíbia, pois o crescimento se dá principalmente nas placas proximal da tíbia e distal do fêmur, no membro inferior ou posterior, ao contrário do membro superior ou anterior. Deve-se ressaltar que uma supressão do crescimento na placa distal da tíbia ou mesmo uma diminuição da espessura da cartilagem articular do tornozelo podem ter interferido nos resultados do comprimento total da tíbia, encontrados nesta pesquisa.

Frost (1990) sugere que compressões axiais pequenas aumentam o crescimento, mas compressões de magnitudes altas podem retardar ou suprimir o crescimento ósseo. Ohashi e col. (2002) observaram que forças, mesmo de baixas magnitudes, podem suprimir o crescimento ósseo. Períodos curtos de apenas 4 dias em aumentos na gravidade, simulando compressões nos ossos, induzem uma diminuição da ossificação endocondral na placa de crescimento (Vico e col., 1999). Um menor comprimento da tíbia, após sessões de impacto, é consistente com estas observações e as de Ohashi e col. (2002), porém ao contrário do que foi observado por Frost (1990) quando sugere que pequenas compressões axiais aumentam o crescimento longitudinal dos ossos. Para o autor, cargas funcionais, em níveis moderados, podem ser necessárias para o crescimento normal e para a manutenção da massa óssea. A hipótese de Frost tem suporte em estudos mostrando que treinamentos leves e de endurance, parecem favorecer o crescimento (Soggard e col., 1994). Porém, exercícios não só envolvem estímulos mecânicos locais, mas também induzem mudanças biológicas sistêmicas como o aumento do fator de crescimento Insulin-Like GFI e atividade metabólica (Nap e Hazewinkel, 1994). Deve-se notar que os estudos com compressões sobre o osso possuem efeito em um sítio específico, e que como no presente, os animais das amostras normalmente estão sob o efeito de sedativos, e não em atividades aeróbias. Esta idéia pressupõe, que os dados dos estudos desta natureza, são influenciados apenas pelos efeitos dos objetivos estudados, e não pelos sistêmicos. No presente estudo, observou-se

uma diferença significativa no comprimento total, entre a tíbia direita e a esquerda. Se não houve viés na medida, os resultados podem ser imputados aos fatores mecânicos locais, pois os animais do estudo estavam sedados e em estado metabólico abaixo do encontrado em atividades físicas, quando os fatores fisiológicos são mais atuantes.

Embora existam estas deduções, Oahshi e col. (2002) utilizaram uma compressão leve (4N), simulando deformações na ulna, similares às medidas na deambulação normal, e não foi observado um aumento do crescimento ósseo. Além disto, é pouco provável que as cargas das atividades diárias aumentem o crescimento longitudinal dos ossos, pois as atividades normais nos ratos não aumentam o crescimento, quando comparadas com estudos que simulam aumentos de gravidades (Simon e Holmes, 1985). Outros autores como Biewener e Bertram (1994) concordam que o aumento das cargas sobre ossos em crescimento leva a mudanças adaptativas benéficas ao menos quando a duração ou a intensidade não é excessiva. Para estes autores, o problema está em definir qual é o ponto aonde o exercício torna-se “excessivo” e pode retardar o crescimento esquelético normal. O presente estudo, assim como a literatura acima, sugere que o crescimento dos ossos longos ocorre normalmente quando a placa de crescimento é submetida à cargas compressivas fisiológicas, mas o crescimento é suprimido quando forças de magnitudes maiores são aplicadas sobre o osso em crescimento, ao menos temporariamente.

Burr e col. (1998) observaram, com compressões cíclicas em 4 pontos do fêmur de cães, que o acúmulo de microlesões é positivamente correlacionado com uma redução no módulo elástico do osso e isto influencia nas propriedades mecânicas do osso. Porém, os autores não encontraram uma associação linear entre o acúmulo de microdanos e mudanças nas propriedades mecânicas do osso. Hsieh e col. (1999) enfatizam que deformações compressivas da ulna de ratos são reduzidas com o aumento da freqüência das cargas aplicadas. Este fenômeno é provavelmente devido às propriedades viscoelásticas dos tecidos que circundam o osso estudado, já que os autores não dissecaram os tecidos moles circundantes ao osso no estudo, assim como na pesquisa descrita nesta tese.

No presente estudo, foram encontradas algumas alterações na placa de crescimento proximal da tíbia correlacionadas com o acúmulo do número de

compressões (impactos) na placa de crescimento. Estas respostas observadas também podem ser devido às propriedades viscoelásticas do osso. A fricção do componente viscoso dos tecidos moles ao redor da tíbia causa uma dissipação da energia, resultando em uma diminuição da transmissão das cargas ao osso, e desta forma, reduzindo as deformações. Bright e col. (1974) afirmam que a placa de crescimento da tíbia de ratos é mais fraca na puberdade e sem os tecidos moles ao seu redor. Se este fenômeno acontece principalmente com altas frequências (Hsieh e col., 1999), embora possa ter ocorrido alguma dissipação de energia, no estudo desta tese, provavelmente ela seja de menor intensidade, pois a frequência de aplicação das cargas compressivas foi muito mais baixa. As frequências utilizadas por Hsieh e col. (1999) foi de 1, 2, 5, 10 e 20 Hz, enquanto que nesta tese foi muito mais baixa (18 impactos por minuto = 0,3 Hz).

Mosley e col. (1997) observam que o encurtamento relativo da ulna de ratos após períodos de compressões axiais é presumidamente adquirido através do retardo da expansão longitudinal na placa de crescimento. Foram observadas mudanças na espessura das zonas de repouso, proliferativa e no número de células na zona proliferativa, bem como uma diminuição da sua espessura, nas tíbias submetidas aos impactos. Também Oahshi e col (2002) encontraram mudanças principalmente na zona hipertrófica e sugeriram que a sobrecarga afeta a mineralização. Segundo estes autores, nesta zona, não só a população de condrócitos é alterada bem como o metabolismo. Como se sabe que a mineralização inicia com a síntese de colágeno tipo X, a hipertrofia dos condrócitos, mineralização da matriz, angiogênese, e, finalmente, a matriz cartilaginosa é remodelada em matriz óssea. Porém, o presente estudo não objetivou pesquisar mudanças no metabolismo da matriz da placa de crescimento e sim determinar se a espessura dela era afetada com as cargas compressivas repetitivas.

O crescimento longitudinal dos ossos longos acontece na placa às custas da mitose na zona de proliferação e da hipertrofia dos condrócitos, na zona hipertrófica (Robling e col., 2001). Com os impactos repetitivos, foi observada, nesta pesquisa, uma diminuição na espessura da zona de proliferação assim como uma diminuição do número médio de células nas colunas desta zona. A diferença no número médio de células nas colunas contribuiu para a diminuição da espessura da placa e pode ter havido também, um achatamento destas células, pelo o efeito das compressões (impactos). Esta hipótese pode ser considerada, pois se existe um

achatamento pela compressão de uma célula contra a outra decorrente da alta taxa de mitoses (Robertson, 1990), talvez as cargas compressivas possam ter um efeito semelhante e adicional nesta zona.

Neste trabalho não foi observado um aumento significativo da espessura na zona hipertrófica e de calcificação quando medidas juntas. De qualquer forma, independentemente de que zona é afetada principalmente, as observações são de que impactos, ou compressões dinâmicas e significativas, podem diminuir o crescimento, ou induzir a uma calcificação precoce da placa. Os animais da amostra que foram submetidos às cargas compressivas durante o período pré-puberal e toda a puberdade não exibiram evidências de fechamento precoce da placa nas medidas realizadas. Com a magnitude de impacto estudada, não foram encontradas imagens de calcificações invadindo as placas analisadas, e elas conservaram a distribuição de todas as zonas, somente com proporções diferentes.

É possível, ainda, que o impedimento completo da mineralização da placa, após os impactos, seja resultado da falta de invasão capilar nestas zonas. Ohashi e col (2002) também não encontraram evidências de invasão capilar na placa de crescimento, porém encontraram, com imunohistoquímica, um vetor da angiogênese em todas as regiões da placa e não só na zona hipertrófica. Uma das limitações deste estudo foi a não utilização de imunohistoquímica, e esta variável pode ser motivo de estudo futuro para esta magnitude de impacto.

Ohashi e col (2002) encontraram evidências de recuperação no crescimento da placa após a parada de 1 semana, na aplicação de forças, com magnitudes de 4Ne 8,5N. Os mesmos autores não observaram este fenômeno com carga de 17 N. O grupo 5 do presente estudo (12 dias de carga), com 10 dias entre a parada da aplicação das cargas e a coleta da tíbia para análise, ainda apresentou diferença significativa entre a placa da tíbia direita e a esquerda. Desta forma, 3,5 vezes a massa corporal pode ser suficiente para produzir efeitos permanentes na placa de crescimento, embora não se tenha encontrado um fechamento da placa neste grupo ou no grupo 6, que ultrapassaram toda a puberdade sob o efeito dos impactos. É de se supor que provavelmente exista uma correlação entre as magnitudes das cargas aplicadas e o período de recuperação da supressão do crescimento. Porém, Ohashi e col (2002) acham que para cargas altas e períodos acima de 1 semana, podem ser necessários para o retorno da ossificação endocondral normal dos ossos dos ratos. Cottalorda e col. (1996) quando estudaram

a formação de pontes ósseas na placa de crescimento no fêmur de coelhos, observaram que períodos de 3 semanas, não foram suficientes para completá-las definitivamente, e que a resistência destas pontes também ainda não estavam definidas. Então, é possível que um seguimento por um período maior, dos ratos, após a parada da aplicação das cargas compressivas, seja necessário para ser exibido um retorno da ossificação endocondral na placa de crescimento proximal da tíbia.

Se estes resultados puderem ser extrapolados para os humanos, os ginastas, quando realizam exercícios que produzem um impacto de aproximadamente 3,5 vezes a sua massa corporal, não apresentam um fechamento precoce da placa de crescimento. Este fenômeno não ocorre embora exista um retardo na espessura da placa e no número de algumas de suas células. Especula-se que períodos longos sejam necessários para que esta zona retome a sua normalidade.

8 - CONCLUSÃO

Após a aplicação de cargas compressivas repetitivas e padronizadas, proporcionais ao ganho de massa corporal, na tíbia direita em uma amostra de ratos, podemos concluir que:

As cargas compressivas repetitivas diminuem a espessura da placa de crescimento proximal da tíbia de ratos, durante a puberdade.

Estes achados são observados principalmente quando o tempo de carga ultrapassa a metade do período de puberdade dos ratos.

Os efeitos principais da diminuição da espessura da placa de crescimento são vistos na zona de proliferação, onde ocorrem as mitoses na placa de crescimento.

Mesmo com a interrupção de 10 dias na aplicação de carga compressiva, permanece a diminuição da espessura da placa proximal da tíbia pressupondo que um período maior seja necessário para a retomada do crescimento normal, se ele voltar a ocorrer.

A carga compressiva repetitiva de aproximadamente 3,5 vezes a massa corporal não é suficiente para exibir evidências de fechamento definitivo precoce da placa de crescimento.

9 – ESTUDOS FUTUROS

Os dados obtidos no presente estudo mostram inúmeras possibilidades de pesquisa neste campo. Uma das delineações possíveis é determinar o período necessário para que obtenha um fechamento completo da placa de crescimento, quando ela é submetida às cargas compressivas repetitivas (impactos repetitivos). Também, há que se determinar o limiar de carga onde os efeitos sobre a placa de crescimento tornam-se irreversíveis e se estes efeitos aparecem, em que espaço de tempo dentro do período de crescimento ósseo.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD V, MEYERS JL, WEISE M, GAFNI RI, BARNES KM, NILSSON O, BACHER JD, BARON J: The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*; 143(5): 1851-57, 2002.

AERSSENS J, BOONEN S, LOWET G, DEQUEKER J: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for *in vivo* bone research. *Endocrinol*; 139(2): 663-70, 1998.

ALBANESE, S.A., PALMER, A.K.; KERR, D.R.; CARPENTER, C.W.; LISI, D.; LEVINSON, E.M.: Wrist pain and distal growth plate closure of the radius in gymnasts. *J Pediatric Orthop* 9: 23-28, 1989.

ALEXANDER, C.J.: Effects of growth rate on the strength of the growth-plate shaft junction. *Skeletal Radiol* 1: 67-76, 1976.

ARAMPATZIS A, BRÜGGEMANN GP, KLAPSING GM: Leg stiffness and mechanical energetic processes during jumping on a sprung surface. *Med Sci Sports Exerc*; 33(6): 923-931, 2001.

ARKIN, A M. e KATZ, J.F.: The effects of pressure on epiphyseal growth. The mechanisms of plasticity of growing bone. *J Bone Joint Surg* 38 A: 1056- 1076, 1956.

BAGI CM, DELEON E, AMMANN P, RIZZOLI R, MILLER SC: Histo-anatomy of the proximal femur in rats: Impact of ovariectomy on bone mass, structure, and stiffness. *Anat Rec*; 245(4): 633-44, 1996.

BASHEY RI, IANNOTTI JP, RAO VH, REGINATO AM, JIMENEZ AS: Comparison of morphological and biochemical characteristics of cultured chondrocytes isolated from proliferative and hypertrophic zones of bovine growth plate cartilage. *Differentiation*; 46: 199-207, 1991.

BASS S, BRADNEY M, PEARCE G, HENDRICH E, INGE K, STUCKEY S, LOSK, SEEMAN E: Short stature and delayed puberty in gymnasts: Influence of selection bias on leg length and the duration of training on trunk length. *J Pediatr*; 136: 149-155, 2000.

BEUNEN G, MALINA RM, CLAESSENS AL, LEFEVRE J, THOMIS M: Ulnar variance and skeletal maturity of radius and ulna in female gymnasts. *Med Sci Sports Exerc*; 31(5): 653-657, 1999.

BIEWENER AA, BERTRAM JE: Structural response of growing bone to exercise and disuse. *J Appl Physiol*; 76(2): 946-955, 1994.

BLACKMAN BR; BARBEE KA; THIBAUT LE: In vitro cell shearing device to investigate the dynamic response of cells in a controlled hydrodynamic environment. *Ann Biomed Eng*; 28(4): 363-72, 2000 Apr.

BRIGHT, RW; BURSTEIN, AH; ELMORE, S.M.: Epiphyseal plate cartilage. A biomechanical and histological analysis of failure models. *J Bone Joint Surg* 56 A: 688- 703, 1974.

BUCKLER JM, BRODIE D.A.: Growth and maturity characteristics of schoolboy gymnasts. *Ann Hum Biol* 4: 455- 463, 1977.

BURR DB, MILGROM C, FYHRIE D, FORWOOD M, NYSKA M, FINESTONE A, HOSHAW S, SAIAG E, SIMKIM A: In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone*; 18 (5): 405-10, 1996.

BURR DB, TURNER CH, NAICK, FORWOOD MR, AMBROSIUS W, HASAN MS, PIDAPARTI R: Does microdamage accumulation affect the mechanical properties of bone? *J Biomech*; 31(4): 337-345, 1998.

BYERS S, MOORE AJ, BYARD RW, FAZZALARI NL: Quantitative histomorphometric analysis of the human growth plate from birth to adolescence. *Bone*; 27(4): 495-501, 2000.

BYERS S, VAN ROODEN JC, FOSTER BK: Structural changes in the large proteoglycan, aggrecan, in different zones of the ovine growth plate. *Cacif Tissue Int*; 60: 71-80, 1997.

CABRAL, AM, KURT, JV e KAPUSTA, DR: Renal excretory responses produced by central administration of opioid agonists in ketamine and xilazine anesthetized rats. *J Pharm Exp Ther*. 282 (2): 609-616. 1997.

CARLSTEDT, C.A. e NORDIN, M. Biomechanics of tendons and ligaments. In: Nordin, M.; Frankel, V.H. (Ed.) *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*; 2^{ed.}, Local: Lea&Febiger: Pennsylvania, 1989, p.59-74.

CARTER DR, BEAUPRÉ GS, GIORI NJ, HELMS JA: Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop*; 355(supp): S41-S55, 1998.

CARTER DR, SMITH DJ, SPENGLER DM, DALY CH, FRANKEL VH: Measurement and analysis of *in vivo* bone strain on the canine radius and ulna. *J Biomechanics*; 13: 27-38, 1980.

CHUNG SMK, BATTERMAN SC, BRIGHTON, CT: Shear strength of the human femoral capital epiphyseal plate. *J Bone Joint Surg* 58 A: 94-103, 1976.

COTTALORDA J, JOUVE JL, BOLLINI G, PANUEL M, GUISIANO B, JIMENO MT: Epiphyseal distraction and centrally located bone bar: an experimental study in the rabbit. *J Ped Orthop*; 16: 664-68, 1996.

DAMSGAARD R, BENCKE J, MATTHIESEN G, PETERSEN JH, MÜLLER J: Is prepubertal growth adversely affected by sports? *Med Sci Sports Exerc*; 32(10): 1698-1703, 2000.

DECHIARA TM, KIMBLE RB, POUYMIROU WT, ROJAS J, MASIAKOWSKI P, VALENZUELA DM, YANCOPOULOS GD: Ror2 encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet*; 24(3): 271-4, 2000.

DIFIORI JP, PUFFER JC, MANDELBAUN BR, DOREY F: Distal radial growth plate injury and positive ulnar variance in nonelite gymnasts. *Am J Sports Med.* 25 (6): p 763-68, 1997.

DIFIORI JP, MANDELBAUM BR: Wrist pain in a young gymnast: unusual radiographic findings and MRI evidence of growth plate. *Med Sci Sports Exerc;* 28(12): 1453-1458, 1997.

DYHRE-POULSEN, P.: An analysis of splits leaps and gymnastic skill by physiological recordings. *Eur J Appl Physiol.* 56: 390-97, 1987.

ERTL, J. P.; BARRACK R.L.; ALEXANDER A.H.; VANBUECKEN K.: Triplane fracture of the distal tibial epiphysis. Long-term follow-up. *J Bone Joint Surg* 70 A: 967-976, 1988.

ETCHEBEHERE EC, CARON M, PEREIRA JA, LIMA MC, SANTOS AO, RAMOS CD, BARROS FB, SANCHES A, SANTOS-JESUS R, BELANGERO W, CAMARGO EE: Activation of the growth plates on three-phase bone scintigraphy: the explanation for the overgrowth of fractured femurs. *Eur J Nucl Med;* 28(1): 72-80, 2001.

FELISBINO SL e CARVALHO HF: the epiphyseal cartilage and growth of long bones in *Rana catesbeiana*. *Tissue&Cell;* 31(3): 301-307, 1999.

FLECKNELL PA. Anesthesia of animals for biomedical research. *Br J Anaesthesia;* 71: 885-94, 1993.

FROST HM: Skeletal structural adaptations to mechanical usage. The hyaline cartilage modeling problem. *Anat Rec;* 226: 423 – 432, 1990.

FROST HM e JEE WS: Perspectives: Applications of a biomechanical model of the endochondral ossification mechanism. *Anat Rec;* 240: 447-455, 1994.

FROST HM e SCHÖNAU E: The muscle-bone unit in children and adolescents: A 2000 overview. *J Ped Endocrin & Metabol;* 13(6): 571-90, 2000.

FROST HM e SCHÖNAU E: On longitudinal bone growth, short stature, and related matters: Insights about cartilage physiology from the Utah paradigm. *J Ped Endocrin Metabol*; 14(5): 481-496, 2001.

FROST HM: From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its applications. *Anat Rec*; 262(4): 398- 419, 2001.

FYHRIE DP; MILGROM C; HOSHAW SJ; SIMKIN A; DAR S; DRUMB D; BURR DB: Effect of fatiguing exercise on longitudinal bone strain as related to stress fracture in humans. *Ann Biomed Eng*; 26(4): 660-5, 1998.

GEORGOPOULOS N, MARKOU K, THEODOROPOULOU A, PARASKEVOPOULOU P, VARAKI L, KAZANTZI Z, LEGLISE M, VAGENAKIS AG: Growth and pubertal development in elite female rhythmic gymnasts. *J Clin Endocrinol Metabol*; 84: 4525-30, 1999.

GOLDING JSR: The mechanical factors wich influence bone growth. *Eur J Clin Nutr*; 48 (S1): 178-85, 1994.

HALL, SJ: Mechanical contribution to lumbar stress injuries in female gymnasts. *Med Sci Sports Exerc*; 18(6): 599-602, 1986.

HAM: Livro Texto de Histologia. Editado por David H. Cormack. Editora Guanabara Koogan. 9º edição. O OSSO: pág. 216- 254. 1991.

HASTINGS, H. e SIMMONS, B. P.: Hand fractures in children. A statistical analysis. *Clin Orthop* 188: 120-130, 1984.

HERT J: Wolff's law of transformation after 100 years. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*; 57(6): 465-75, 1990.

HILLAM RA e SKERRY TM: Inhibition of bone resorption and stimulation of formation by mechanical loading of the modeling rat ulna in vivo. *J Bone Miner Res*; 10(5): 683-89, 1995.

HOLLAND, AJC: Laboratory animal anaesthesia. *Canad Anaesth Soc J*. 20 (5): 693 – 705, 1993.

HOSHAW SJ; FYHRIE DP; TAKANO Y; BURR DB; MILGROM C: A method suitable for in vivo measurement of bone strain in humans. *J Biomech*; 30(5):521-4, 1997.

HOWARD CS, BLAKENEY DC, MEDIGE J, MOY OJ, PEIMER CA: Functional assessment in the rat ground reaction forces. *J Biomech*; 33: 751-57, 2000.

HSIEH Y-F, WANG T, TURNER CH: Viscoelastic response of the rat loading model: implications for studies of strain-adaptative bone formation. *Bone*; 25(3): 379-82, 1999.

HSIEH Y-F; ROBLING AG; AMBROSIUS WT; BURR DB; TURNER CH.: Mechanical loading of diaphyseal bone in vivo: the strain threshold for an osteogenic response varies with location. *J Bone Miner Res*; 16(12): 2291-7, 2001.

IRANI RN: Physiologic bowing in children: an analysis of the pendulum mechanism. *J Pediatr Orthop B*; 4(1): 100-05, 1995.

IWAMOTO J, YEH JK, ALOIA JF: Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in young growing rats. *Bone*; 24(3): 163-169, 1999.

JOST-RELYVELD A, SEMPÉ M: Analyse de la croissance et de la maturation squelettique de 80 jeunes gymnastes internationaux. *Pediatric*; 4: 247-62, 1982.

JUDEX S e ZERNICKE FR: Does the mechanical milieu associated with high-speed running lead to adaptive changes in diaphyseal growing bone? *Bone*; 26 (2): 153-59, 2000.

LAMMERS AR; GERMAN RZ; LIGHTFOOT PS: The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat (Basel)*; 162(4):199-208, 1998.

LANYON LE, SMITH RN: Bone strain in the tibia during normal quadrupedal locomotion. *Acta Orthop Scand*; 41: 238-48, 1970.

LANYON LE, SMITH RN: Measurements of bone strain in the walking animal. *Res Vet Sci*; 10: 93-4, 1969.

LANZIOTTI, V. M.N.B; BARROS, H.M.T.; TANNHAUSER, S.L. et al. Padrões éticos para a utilização de animais de laboratório em pesquisa médica. *Pesquisa Méd.* 28, (2), 26-30, 1994.

LEESON TS e LEESON CR: Histologia, Editora Atheneu, 2ª edição, Osso:116-133, 1970.

LERNER AL, KUHN JA, HOLLISTER SJ: Are regional variations in bone growth related to mechanical stress and strain parameters? *J Biomech*; 31(4): 327-35, 1998.

LIGHT, T. R. e OGDEN, J. A.: Metacarpal epiphyseal fractures. *J Hand Surg* 12 A: 460-464, 1987.

LINDHOLM C, HAGENFELDT K, RINGERTZ BM: Pubertal development in elite juvenile gymnasts. Effects of physical training. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 73: 269-273, 1994.

LINDHOLM C, HAGENFELDT K, HAGMAN U: A nutrition study in a juvenile elite gymnasts. *Acta Paediatr*; 84: 273-277, 1995.

LIPPIELLO L, BASS R, CONNOLLY JF: Stereological study of the developing distal femoral growth plate. *J Orthop Res*; 7(6): 868-875: 1989.

LOMBARDO SJ, e HARVEY JP: Fractures of the distal femoral epiphyses. Factors influencing prognosis: A Review of thirty-four cases. *J Bone Joint Surg* 59 A :742-751,1977.

MAcMAHON EB, CARMINES DV, IRANI RN: Physiologic bowing in children: an analysis of the pendulum mechanism. *J Pediatr Orthop B*; 4(1): 100-05, 1995.

MAFFULLI N e BRUNS W: Injuries in young athletes. *Eur J Pediatr*; 159 (1-2): 59-63, 2000.

MALINA RM: Exercise as an influence upon growth. Review and Critique of Current Concepts. *Clin Ped*; 8(1): 16-26, 1969.

MANSFIELD MJ, EMANS SJ: Growth in female gymnasts: Should training decrease during puberty? *J. Pediatr.* 122, (2): 237 – 240, 1993.

MARKOLF K; SHAPIRO M et al: Wrist loading patterns during pommel horse exercises. Unpublished data. Citados em WASCHER DC e FINERMAN GAM: Physeal injuries in Young athletes in *Pediatrics and Adolescents Sports Medicine*, vol 3, edited by: Carl L. Stanitski, Jesse DeLee, David Drez Jr.; W.B. Saunders Company: p. 144- 161, 1994.

MARQUES RM: Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiros II. Altura e Peso. São Paulo, Editora Brasileira de Ciências, 1982.

MASSONE T: Técnicas anestésicas de laboratório in *Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas*. Guanabara Koogan. 102-131: 1988.

MATSUI Y, ALINI M, WEBBER C, POOLE R: Characterization of aggregating proteoglycans from the proliferative, maturing, hypertrophic, and calcifying zones of the cartilaginous physis. *J Bone Joint Surg*; 73-A (7): 1064-74, 1991.

MIZUTA, T.; BENSON W.M.; FOSTER B.K.; PATERSON D.C.; MORRIS L.L.: Statistical analysis of the incidence of physeal injuries. *J Pediatr Orthop* 7: 518-523, 1987.

MOSLEY JR, MARCH BM, LYNCH J, LANYON LE: Strain magnitude related changes in whole bone architecture in growing rats. *Bone*; 20(3): 191-198, 1997.

NAP, RC, HAZEWINKEL HAW: Growth and skeletal development in the dog in relation to nutrition; a review. *Vet Quart*; 1(16): 50-9, 1994.

NEER, C. S. e HORWITZ, B. S.: Fractures of the proximal humeral epiphysial plate. *Clin Orthop* 41: 24-35, 1965.

OGDEN JA, GANEY TM, OGDEN DA: The Biological Aspects of Children's Fractures: Biomechanics of the Child's Musculoskeletal System. Capter 2 in *Factures in Children*, 4ª edição editado por Rocwood, Wilkins e Beaty. Lippincott-Raven: versão eletrônica, 1996.

OGDEN, JA: Development and Maturation of the Neuromusculoskeletal System in *Lovel and Winter's Pediatric Orthopaedics* ed. by Raymond T. Morrissy, J.B. Lippincott Company, Philadelphia. p. 1-26, 1990.

OHASHI N, ROBLING AG, BURR DB, TURNER CH: The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Min Res*; 17(2): 284-92, 2002.

OJEDA, S.R. e URBANSKI, H.F. citados em CASTRO, M.E.; AYALA, M.E.; MONROY, J. et al: Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropin levels and ovarian hormones during puberty of the female rat. *Brain Res Bull*, 54 (4): 345-352, 2001.

ÖZ OK, MILLSAPS R, WELCH R, BIRCH J, ZERWEKH JE: Expression of aromatase in the human growth plate. *J Mol Endocrinol*; 27: 249-53, 2001.

PETERSON, CA e PETERSON, H. A.: Analysis of the incidence of injuries to the epiphyseal growth plate. *J Trauma* 12: 275-281, 1972.

PIGEON, P; OLIVER I; CHARLET J.P.; et al.: Intensive Dance Practice. Repercussions on Growth and Puberty. *AJSM* 25: 243- 47, 1997.

RAAB-CULLEN DM, AKHTER MP, KIMMEL DB, RECKER RR: On animal models for studying bone adaptations. *Calcif Tissue Int*; 55(4): 317, 1994.

RAYMUNDO MM, GOLDIM JR. Diretrizes para a utilização de animais em experimentos científicos. www.bioetica.ufrgs.br/animdir.htm; 05/12/2000.

REICH, D.L. E SILVAY, G.: Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth*.36: 2. 186-97, 1989.

ROBERTSON WW: Newest knowledge of the growth plate. *Clin Orthop*; 253: 270-8, 1990.

ROBLING AG, DUIJVELAAR KM, GEEVERS JV, OHASHI N, TURNER CH: Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone*; 29(2): 105-13, 2001, (b).

ROBLING AG; BURR DB; TURNER CH: Partitioning a daily mechanical stimulus into discrete loading bouts improves the osteogenic response to loading. *J Bone Miner Res*; 15(8): 1596-602, 2000.

ROBLING AG; BURR DB; TURNER CH: Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J Exp Biol*; 204(Pt 19): 3389-99, 2001, (a).

RODRIGUEZ JI, RAZQUIN S, PALACIOS J, RUBIO V: Human growth plate development in the fetal and neonatal period: *J Orthop Res*; 10: 62-71, 1992.

RODRIGUEZ JP, ROSSELOT G: Effects of zinc on cell proliferation and proteoglycan characteristic of epiphyseal chondrocytes. *J Cell Biochem*; 82(3): 501-11, 2001.

ROOS, MICHAEL H: Histologia: Texto e Atlas. 2ª edição. Editora Panamericana. O Osso. Pág. 141-159. 1993.

ROWAN AN: Research protocol design and laboratory animal research. *Invest Radiol*; 22: 615-17, 1987.

RUBIN CT, LANYON LE: Limb mechanics as a function of speed and gait: a study of functional strains in the radius and tibia of horse and dog. *J Exp Biol*; 101: 187-211, 1982.

SALTER, RB; HARRIS, WR: Injuries involving the epiphyseal plate. *J Bone Joint Surg* 45 A: 587-622, 1963.

SCHNIRRING L: Sports training and growth delay: Is there a connection? *Phys SportsMed*; 29(2): 23-27, 2001.

SCHWIDERGALL S, WEIMANN E, WITZEL C, MÖLENKAMP G, BREHL S, BÖHLES H: Eating behavior in female and male elite gymnasts. *Wien Med Wschr*; 148: 243-244, 1998.

SIMON MR, HOLMES RK: The effects of simulated increase in body weight on the developing rat tibia: A histologic study. *Acta Anat*; 122: 105-109, 1985.

SIMON MR, PAPIERSKI P: Effects of experimental bipedalism on the growth of the femur and tibia in normal and hypophysectomized rats. *Acta Anat*; 114: 321-29, 1982.

SIMON MR: The effect of dynamic loading on the growth of epiphyseal cartilage in the rat. *Acta Anat* 102: 176-183, 1978.

SOGAARD CH, DANIELSEN CC, THORLING EB, MOSEKILDE L: Long-term exercise of young and adult female rats: effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. *J Bone Miner Res*; 9(3): 409-16, 1994.

TANNER, J.M. e WHITEHOUSE, R.H.: Clinical longitudinal for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Chil*. 51: 170-179, 1976.

THEINZ GE, HOWALD H, WEISS U, SIZONENKO PC: Evidence for a reduction of growth potential in adolescent female gymnasts. *J Pediatr*; 122: 306-313, 1993.

THORP BH e DIXON JM: Cartilaginous bone extremities of growing monotremes appear unique. *Anat Rec*; 229: 447-52, 1991.

TORG, J. S.; PAVLOV H.; MORRIS V.B.: Salter-Harris type-III fracture of the medial femoral condyle occurring in the adolescent athlete. *J Bone Joint Surg* 63 A: 586-591, 1981.

TORRANCE AG, MOSLEY JR, SUSWILLO RFL, LANYON LE: Noninvasive loading of the rat ulna in vivo induces a strain-related modeling response uncomplicated by trauma or periosteal pressure. *Calcif Tissue Int*; 54: 241-47, 1994.

TORRE, B. A.: Epiphyseal injuries in the small joints of the hand. *Hand Clinics* 4: 113-121, 1988.

TSENG KF, GOLDSTEIN AS: Systemic over-secretion of growth hormone in transgenic mice result in a specific pattern of skeletal modeling and adaptation. *J Bone Miner Res*; 13(4): 706-15, 1998.

TURNER CH, FORWOOD MR: On animal models for studying bone adaptation. *Calcif Tissue*; 55: 316-18, 1994.

TURNER CH: Effects of tissue viscoelasticity on mechanical models using rats. *Bone*; 25(6): 742, 1999, (b).

TURNER CH: Muscle-bone interactions, revisited. *Bone*; 27(3): 339-40, 2000.

TURNER CH: Site-specific skeletal effects of exercise: Importance of interstitial fluid pressure. *Bone*; 24(3): 161-62, 1999, (a).

TURNER CH; ROEDER RK; WIECZOREK A; FOROUD T; LIU G; PEACOCK M: Variability in skeletal mass, structure, and biomechanical properties among inbred strains of rats. *J Bone Miner Res*; 16(8): 1532-9, 2001.

TURNER CH; YOSHIKAWA T; FORWOOD MR; SUN TC; BURR DB: High frequency components of bone strain in dogs measured during various activities. *J Biomech*; 28(1): 39-44, 1995.

TURNER CH, PAVALKO FM: Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci*; 3(6): 346-55, 1998.

VAN DER MEULEN MC; ASHFORD MW; KIRATLI BJ; BACHRACH LK; CARTER DR. Determinants of femoral geometry and structure during adolescent growth. *J Orthop Res*; 14(1): 22-9, 1996.

VAN DER MEULEN MCH e CARTER DR: Development mechanics determine long bone allometry. *J Theor Biol*; 172: 323-27, 1995.

VANKY P, BROCKSTEDT, NURMINEN M, WIKSTRÖM B, HJERPE A: Growth parameters in the epiphyseal cartilage of brachymorphic (bm/bm) mice. *Calcif Tissue Int*; 60: 355-62, 2000.

VICO L, BAROU O, LAROCHE N, ALEXANDRE C, LAFAGE-PROUST MH: Effects of centrifuging at 2g on rat long bone metaphyses. *Eur J Appl Physiol*; 80(4): 360-66, 1999.

WATKINS S: Bone disease in patients receiving growth hormone. *Kidney Int Suppl*; 49(53): S126-27, 1996.

WEIMANN E, WITZEL C, SCHWIDERGALL S, BÖHLES HJ: Effects of high intensity training on pubertal development of female and male elite gymnasts. *Wien Med Wschr*; 148: 231-234, 1998.

WEISE M, DE-LEVI S, BARNES KM, GAFNI RI, ABAD V, BARON J: Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(12): 6871-6, 2001.

WHITE, P.F.; WAY, L. W. e TREVOR, A. J.: Ketamine – Its pharmacology and therapeutic use. *Anesthesiology*. 56: 119-136, 1982.

WUTHIER RE, WU LNY, SAUER GL, GENGE BR, YOSHIMORI T, ISHIKAWA Y: Mechanism of matrix vesicle calcification: characterization of ion channels and the nucleational core of growth plate vesicles. *Bone and Mineral*; 17(2): 290-95, 1992.

YENI YN, FYHRIE DP: Fatigue damage-fracture mechanics interaction in cortical bone. *Bone*; 30(3): 509-514, 2002.

YOSHIKAWA T; MORI S; SANTIESTEBAN AJ; SUN TC; YOSHIKAWA T; MORI S; SANTIESTEBAN AJ; SUN TC; HAFSTAD E; CHEN J; Burr DB: The effects of muscle fatigue on bone strain. *J Exp Biol*; 188:217-33, 1994.

YOUNG-IN LEE F, RHO JY, HARTEN Jr R, PARSONS JR, BEHRENS FF: Micromechanical properties of epiphyseal trabecular bone and primary spongiosa around the physis: an in situ nanoindentation study. *J Pediatr Orthop*; 18 (5): 582-85, 1998.

11 – ANEXOS 1 (Tabelas com as medidas em mm das variáveis estudadas).

Tabela 7: Medidas dos parâmetros no grupo 1. As medidas são em mm e as letras D e E representam a tíbia direita e esquerda respectivamente.

Rato	Comprimento da Tíbia		Espessura da Placa		Espessura da Zona de Repouso		Espessura da Zona de Proliferação		Número de Células Proliferativas		Espessura das Zona s Hipertrófica e Calcificação	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	27,40	27,00	0,54	0,56	0,09	0,10	0,25	0,25	17	18	0,20	0,21
2	26,40	26,20	0,50	0,49	0,10	0,10	0,20	0,20	15	16	0,20	0,19
3	25,20	25,40	0,50	0,50	0,10	0,10	0,20	0,20	15	16	0,20	0,20
4	25,50	25,50	0,50	0,48	0,10	0,08	0,16	0,15	18	18	0,24	0,25
5	28,20	28,40	0,45	0,45	0,08	0,08	0,16	0,15	18	17	0,21	0,22
6	25,00	25,10	0,55	0,55	0,10	0,10	0,25	0,23	18	17	0,20	0,22
7	27,00	27,00	0,40	0,43	0,06	0,06	0,20	0,20	16	16	0,14	0,17
8	25,50	25,50	0,43	0,40	0,08	0,09	0,15	0,15	17	15	0,20	0,16
9	27,90	28,00	0,50	0,45	0,07	0,07	0,25	0,20	19	18	0,18	0,18
10	24,50	24,70	0,40	0,40	0,08	0,07	0,17	0,18	16	17	0,15	0,15

Tabela 8: Medidas dos parâmetros no grupo 2. As medidas são em mm e as letras D e E representam a tibia direita e esquerda respectivamente.

Rato	Comprimento da Tibia		Espessura da Placa		Espessura da Zona de Repouso		Espessura da Zona de Proliferação		Número de Células Proliferativas		Espessura das Zonas Hipertrófica e Calcificação	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	29,00	29,00	0,40	0,40	0,07	0,07	0,16	0,17	18	17	0,17	0,17
2	27,20	27,50	0,46	0,46	0,07	0,07	0,23	0,21	23	22	0,16	0,17
3	28,30	28,50	0,38	0,40	0,07	0,09	0,18	0,20	19	18	0,13	0,11
4	26,90	27,00	0,51	0,50	0,10	0,10	0,20	0,20	21	20	0,21	0,20
5	29,00	29,00	0,40	0,40	0,06	0,05	0,20	0,20	19	19	0,14	0,15
6	27,80	28,00	0,40	0,40	0,08	0,08	0,18	0,17	18	18	0,14	0,15
7	29,40	31,00	0,50	0,50	0,09	0,10	0,20	0,23	19	19	0,21	0,17
8	28,50	29,10	0,40	0,40	0,06	0,06	0,16	0,15	18	18	0,18	0,19
*9	29,50	28,90	0,33		0,05		0,20		14		0,08	
10	29,70	30,00	0,40	0,40	0,07	0,07	0,15	0,15	16	15	0,18	0,18

* Os dados da tibia esquerda não foram medidos no microscópio por defeito na lâmina correspondente.

Tabela 9: Medidas dos parâmetros no grupo 3. As medidas são em mm e as letras D e E representam a tibia direita e esquerda respectivamente.

Rato	Comprimento da Tibia		Espessura da Placa		Espessura da Zona de Repouso		Espessura da Zona de Proliferação		Número de Células Proliferativas		Espessura das Zonas Hipertrófica e Calcificação	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	27,50	27,5	0,48	0,50	0,08	0,08	0,23	0,23	18	20	0,17	0,19
2	28,50	30,00	0,50	0,50	0,09	0,08	0,20	0,20	16	15	0,21	0,22
3	29,60	29,6	0,33	0,36	0,06	0,07	0,13	0,16	14	16	0,14	0,13
4	29,80	30,00	0,40	0,40	0,07	0,07	0,13	0,16	15	17	0,20	0,17
5	30,50	31,10	0,35	0,36	0,06	0,05	0,16	0,15	11	13	0,13	0,16
6	31,00	32,00	0,38	0,40	0,06	0,07	0,18	0,20	15	15	0,14	0,13
7	31,00	31,20	0,35	0,35	0,05	0,05	0,10	0,13	15	15	0,20	0,17
8	30,00	30,00	0,40	0,45	0,06	0,06	0,20	0,20	18	19	0,14	0,19
9	30,6	31,00	0,40	0,46	0,05	0,05	0,25	0,30	17	18	0,10	0,11
10	29,8	30,3	0,35	0,4	0,06	0,08	0,15	0,2	17	17	0,14	0,12

Tabela 10: Medidas dos parâmetros no grupo 4. As medidas são em mm e as letras D e E representam a tíbia direita e esquerda respectivamente.

Rato	Comprimento da Tíbia		Espessura da Placa		Espessura da Zona de Repouso		Espessura da Zona de Proliferação		Número de Células Proliferativas		Espessura das Zonas Hipertrófica e Calcificação	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	29,00	30,10	0,35	0,40	0,05	0,07	0,13	0,20	17	17	0,17	0,13
2	30,10	30,40	0,40	0,40	0,08	0,08	0,20	0,25	16	17	0,12	0,07
3	31,00	30,00	0,43	0,50	0,05	0,06	0,20	0,25	18	18	0,18	0,19
4	28,50	29,20	0,40	0,45	0,07	0,08	0,16	0,23	15	16	0,17	0,14
5	30,80	31,40	0,40	0,50	0,07	0,10	0,16	0,20	12	16	0,17	0,20
6	27,00	28,10	0,30	0,50	0,06	0,07	0,10	0,25	14	20	0,14	0,18
7	30,50	30,70	0,33	0,40	0,06	0,06	0,15	0,20	14	15	0,12	0,14
8	29,50	30,00	0,50	0,50	0,07	0,08	0,20	0,23	20	20	0,23	0,19
9	30,40	31,50	0,40	0,40	0,05	0,05	0,13	0,20	18	21	0,22	0,15
10	29,80	30,40	0,45	0,53	0,06	0,09	0,20	0,25	19	21	0,19	0,19

Tabela 11: Medidas dos parâmetros no grupo 5. As medidas são em mm e as letras D e E representam a tibia direita e esquerda respectivamente.

Rato	Comprimento da Tibia		Espessura da Placa		Espessura da Zona de Repouso		Espessura da Zona de Proliferação		Número de Células Proliferativas		Espessura das Zonas Hipertrófica e Calcificação	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	29,50	30,50	0,40	0,50	0,07	0,08	0,16	0,25	18	19	0,17	0,17
2	29,20	29,60	0,40	0,46	0,10	0,11	0,16	0,20	16	16	0,14	0,15
3	30,00	31,10	0,33	0,33	0,05	0,05	0,15	0,15	10	13	0,13	0,13
4	32,00	32,40	0,36	0,40	0,09	0,09	0,15	0,18	15	18	0,12	0,13
5	30,50	31,60	0,36	0,40	0,08	0,09	0,15	0,20	16	18	0,13	0,11
6	27,60	29,00	0,33	0,40	0,05	0,08	0,18	0,20	18	20	0,13	0,15
7	31,40	31,90	0,33	0,36	0,07	0,08	0,13	0,15	12	12	0,13	0,13
8	31,40	31,60	0,43	0,50	0,07	0,10	0,20	0,23	17	20	0,16	0,17
9	32,50	32,50	0,40	0,40	0,05	0,05	0,16	0,20	17	21	0,19	0,15
*10	26,50	27,60		0,36		0,06		0,16		15		0,14

* Os dados da tibia direita não foram medidos no microscópio por defeito na lâmina correspondente.

Tabela 12: Medidas dos parâmetros no grupo 6. As medidas são em mm e as letras D e E representam a tibia direita e esquerda respectivamente.

Rato	Comprimento da Tibia		Espessura da Placa		Espessura da Zona de Repouso		Espessura da Zona de Proliferação		Número de Células Proliferativas		Espessura das Zonas Hipertrófica e Calcificação	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	32,60	32,40	0,40	0,55	0,10	0,10	0,15	0,25	17	19	0,15	0,20
2	32,00	32,10	0,45	0,45	0,08	0,09	0,20	0,25	18	19	0,17	0,11
3	31,80	31,70	0,36	0,40	0,06	0,08	0,16	0,20	17	20	0,14	0,12
4	32,80	32,80	0,30	0,33	0,10	0,10	0,13	0,13	16	15	0,07	0,10
5	30,80	31,00	0,36	0,40	0,09	0,09	0,13	0,20	11	16	0,14	0,10
6	32,20	32,20	0,40	0,40	0,08	0,10	0,15	0,16	14	14	0,17	0,40
7	31,50	31,00	0,33	0,38	0,05	0,05	0,13	0,17	12	13	0,15	0,16
8	32,50	32,50	0,30	0,40	0,05	0,07	0,13	0,16	14	16	0,12	0,17
9	32,00	31,90	0,33	0,39	0,07	0,10	0,13	0,18	10	14	0,13	0,11
10	32,70	32,90	0,46	0,50	0,06	0,08	0,23	0,25	18	18	0,17	0,17

12 - ANEXOS 2 (Tabelas com as médias, DP e valores de t e p das medidas entre os grupos).

Tabela 13: Médias, Desvios Padrão, valores de t e p em cada grupo e entre os grupos para as medidas comprimento total da tíbia e espessura da placa de crescimento. As medidas foram realizadas em mm.

Grupos	Comprimento total da tíbia na pata direita	Comprimento total da tíbia na pata esquerda		Espessura da placa de crescimento na pata direita	Espessura da placa de crescimento na pata esquerda	
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
1	26,26 ± 1,30	26,28 ± 1,26	t* = - 0,33 (p=0,751)	0,48 ± 0,054	0,47 ± 0,056	t = 0,82 (p=0,434)
2	28,53 ± 0,97	28,80 ± 1,16	t = - 1,50 (p=0,162)	0,42 ± 0,056	0,43 ± 0,044	t = 0,00 (p=1,000)
3	29,83 ± 1,11	30,27 ± 1,22	t = -2,84 (p=0,019)	0,39 ± 0,057	0,42 ± 0,056	t = -3,34 (p=0,009)
4	29,66 ± 1,22	30,18 ± 1,00	t = -2,63 (p=0,027)	0,40 ± 0,058	0,46 ± 0,054	t = -3,25 (p=0,010)
5	30,06 ± 1,92	30,78 ± 1,60	t = -4,81 (p=0,001)	0,37 ± 0,038	0,41 ± 0,058	t = -4,12 (p=0,003)
6	32,09 ± 0,62	32,05 ± 0,66	t = 0,61 (p=0,555)	0,37 ± 0,057	0,42 ± 0,064	t = -3,58 (p=0,006)
	F* =23,55 (p=0,000)	F=28,10 (p=0,000)		F= 5,42 (p=0,000)	F= 1,90 (p=0,109)	

* Teste t para amostras pareadas

** Teste F da Análise de Variância

Tabela 14: Médias, Desvios Padrão, valores de t e p em cada grupo e entre os grupos para as medidas da espessura da zona de repouso e da zona proliferativa. As medidas foram realizadas em mm.

Grupos	Espessura da zona de repouso na pata direita	Espessura da zona de repouso na pata esquerda		Espessura da zona proliferativa na pata direita	Espessura da zona proliferativa na pata esquerda	
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
1	0,086 ± 0,014	0,085 ± 0,015	t= 0,36 (p=0,726)	0,20 ± 0,039	0,19 ± 0,034	t= 1,50 (p=0,168)
2	0,072 ± 0,015	0,077 ± 0,017	t= -0,80 (p=0,447)	0,19 ± 0,025	0,19 ± 0,029	t= -0,22 (p=0,834)
3	0,064 ± 0,013	0,066 ± 0,013	t= -0,69 (p=0,509)	0,17 ± 0,048	0,19 ± 0,048	t= -2,93 (p=0,017)
4	0,062 ± 0,010	0,074 ± 0,015	t= -3,34 (p=0,009)	0,16 ± 0,036	0,23 ± 0,024	t= -5,97 (p=0,000)
5	0,070 ± 0,018	0,079 ± 0,020	t= -2,86 (p=0,021)	0,16 ± 0,019	0,19 ± 0,033	t= -4,26 (p=0,003)
6	0,074 ± 0,019	0,086 ± 0,016	t= -3,34 (p=0,009)	0,15 ± 0,035	0,20 ± 0,043	t= -4,44 (p=0,002)
	F= 3,22 (p=0,013)	F= 2,08 (p=0,083)		F= 2,50 (p=0,042)	F= 1,64 (p=0,167)	

* Teste t para amostras pareadas

** Teste F da Análise de Variância

Tabela 15: Médias, Desvios Padrão, valores de t e p em cada grupo e entre os grupos para contagem do número médio de células nas colunas da zona de proliferação e da espessura das zonas de hipertrófica e de calcificação. As medidas foram realizadas em mm.

Grupos	Número de células da zona proliferativa na pata direita	Número de células da zona proliferativa na pata esq.		Espessura das zonas hipertrófica e calcif. na pata direita	Espessura das zonas hipertrófica e calcif. na pata esquerda	
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
1	16,90 ± 1,37	16,80 ± 1,03	t= 0,29 (p=0,780)	0,19 ± 0,030	0,19 ± 0,032	t= -0,34 (p=0,746)
2	18,50 ± 2,46	18,44 ± 1,94	t= 3,16 (p=0,013)	0,16 ± 0,039	0,17 ± 0,027	t= 0,58 (p=0,580)
3	15,60 ± 2,12	16,50 ± 2,12	t= -2,59 (p=0,029)	0,16 ± 0,036	0,16 ± 0,036	t= -0,24 (p=0,817)
4	16,30 ± 2,54	18,10 ± 2,23	t= -2,86 (p=0,019)	0,17 ± 0,037	0,16 ± 0,040	t= 1,09 (p=0,304)
5	15,44 ± 2,74	17,40 ± 3,06	t= -5,55 (p=0,001)	0,14 ± 0,024	0,14 ± 0,019	t= 0,18 (p=0,860)
6	14,70 ± 2,95	16,40 ± 2,46	t= -2,85 (p=0,019)	0,15 ± 0,018	0,14 ± 0,033	t= 0,45 (p=0,665)
	F= 3,06 (p=0,017)	F= 1,41 (p=0,235)		F= 2,42 (p=0,048)	F= 2,98 (p=0,020)	

* Teste t para amostras pareadas

** Teste F da Análise de Variância