Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao
Aparelho Locomotor

BRÍGIDA BATISTA BRANCALEON

Resposta do tecido ósseo ao treinamento de salto concêntrico,
excêntrico e combinado. Estudo experimental em ossos de ratas

Versão Corrigida

Ribeirão Preto
2017

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao
Aparelho Locomotor

BRÍGIDA BATISTA BRANCALEON

Resposta do tecido ósseo ao treinamento de salto concêntrico,
excêntrico e combinado. Estudo experimental em ossos de ratas

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citado a fonte.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Brancaleon, Batista. Brígida

Resposta do tecido ósseo ao treinamento de salto concêntrico, excêntrico e combinado. Estudo experimental em ossos de ratas. Ribeirão Preto, 2017.99 p.: Il; 30 cm

Versão Corrigida

Dissertação de Mestrado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador. Prof. Dr. Shimano, Antônio Carlos.

1. Treinamento 2. Contração muscular 3. Ratas 4. Ossos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Brígida Batista Brancaleon

Título: Resposta do tecido ósseo ao treinamento de salto concêntrico, excêntrico e combinado. Estudo experimental em ossos de ratas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4)Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Dedico aos meus pais Onilde Batista Brancaleon e Itamar Brancaleon, por todo o apoio, amor, conselhos e ensinamentos que eles me deram nesta jornada, e que sem eles eu não seria nada, vocês me deram força nas horas mais difíceis, agradeço a Deus todos os dias pelos pais incríveis que ele me deu, amo vocês, obrigada por tudo que sou.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me proporcionado momentos inesquecíveis, de grande aprendizado, experiência e principalmente forças para prosseguir nesses anos de mestrado.

Ao meu Irmão Itamar Brancaleon Júnior, pela amizade e amor.

Ao meu noivo Luís Alberto Batistão, por todo apoio nos momentos mais difíceis e turbulentos, amor, amizade, compreensão e principalmente pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, pela compreensão e conselhos que levarei para a vida toda, pela ética, preocupação e principalmente pelos ensinamentos nas horas mais oportunas, esses valores me tornaram uma pessoa mais forte e compreensiva, onde fez com que eu crescesse a cada dia durante todo o período de pós-graduação, levarei esses ensinamentos por toda a vida.

AGRADECIMENTO

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. José Batista Volpon**, pela dedicação, profissionalismo e por disponibilizar o acesso ao laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo e os recursos indispensáveis para a realização do experimento.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Riberto**, pela coordenação do Programa de Pós-Graduação, profissionalismo e dedicação.

Aos Funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Maria Teresinha Moraes, Carmelita (Lu), Ariane Zamariolli, Luís Henrique Alves Pereira, Francisco Mazzocato (Chico), Carlos Moro, Reginaldo Trevilato e Ismar Ribeiro**, pela ajuda, convívio e amizade.

A funcionária do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Maria Rita Cossalter** pela dedicação, ajuda, convívio e amizade.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Okubo**, pelo ensinamento nas aulas, oportunidade de realizar o meu mestrado, pela parceria em diversos trabalhos e pela amizade.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, **Gabriela Rezende Yanagihara**, pela amizade, apoio, viagens e principalmente pelos momentos de conversas, conselhos e nas horas de inúmeras explicações sobre estatística. **Roberta Carminati Shimano**, pelo carinho, amizade, brincadeiras, viagens e por me mostrar que “o que temos para hoje sempre será a saudades”, **Jacqueline Atsuko Tida**, pelo apoio em todos os momentos do meu mestrado e principalmente pela amizade que se fortaleceu depois da pós-graduação, **Ana Paula Macedo**, pelos inúmeros momentos de dúvidas retiradas, pela hospitalidade, carinho e amizade, **Jéssica Suzuki Yamanaka**, pela amizade, carinho e por me entender, **Bruna Leonel Carlos**, pelo carinho e amizades nos anos de pós-graduação e **Álvaro César de Oliveira Penoni**, pela amizade, e carinho com o meu trabalho.

Em geral agradeço **a todos** pela ajuda no projeto de pesquisa e na minha dissertação, vocês me ensinaram que através da amizade conseguimos alcançar nossos sonhos e objetivos, que neste tempo não ganhei **AMIGOS**, mas sim **IRMÃ, que levarei para**

a vida toda, agradeço pelo companheirismo nas disciplinas e nas viagens, esses momentos foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

As **minhas colegas** que passaram rápido por essa jornada **Aline Goulart de Paiva** e **Patrícia Sena Pinheiro**.

Aos meus **amigos externos ao laboratório** que contribuíram, para que eu conseguisse alcançar meus sonhos.

Ao **Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação** do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Ao **Departamento de Química**, Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura pela disposição e profissionalismo do técnico **Rodrigo Ferreira Silva**. Agradeço pela dedicação.

A todos que me ajudaram direta e/ou indiretamente, nesta jornada de crescimento.

EPÍGRAFE

Epígrafe

*“Estarás sob a proteção do SENHOR, ao saíres e ao voltares, desde agora e
para todo o sempre.”*

Salmo 121,122

Resumo

BRANCALEON, B.B. **Resposta do tecido ósseo ao treinamento de salto concêntrico, excêntrico e combinado. Estudo experimental em ossos de ratas.** 2017. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do treinamento de queda livre com predominância de contração muscular excêntrica, concêntrica e a combinação desses dois tipos saltos, nas propriedades mecânicas e morfométricas de ossos de ratas. Foram utilizadas (n=32) trinta e duas ratas Wistar, divididas em 4 grupos (n=8). Após uma semana de adaptação ao protocolo de treinamento, os animais foram submetidos a oito semanas de treinamento com 10 saltos por dia, cinco dias na semana. O protocolo de treinamento consistiu: Grupo concêntrico (GC): 10 saltos a uma altura de 40cm; Grupo excêntrico (GE): queda livre de uma altura de 35,7cm; Grupo combinado (GCOMB): protocolo simultâneo GC + GE. Os animais do Grupo controle (GCONT) permaneceram na caixa por 9 semanas sem nenhum treinamento. Os animais foram pesados semanalmente, os dados de força máxima obtidos através da plataforma de força (PF) foram colhidos semanalmente. Após o período experimental os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de anestésico. Os úmeros e fêmures foram retirados e dissecados. Os ossos esquerdos foram utilizados na avaliação qualitativa em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os ossos direitos foram avaliados quanto à massa (g), comprimento (mm), Densidade Mineral Óssea (DMO) (g/cm²), Força máxima (N) e Rigidez relativa (N/mm). A análise estatística foi realizada através do programa SPSS® (SPSS® IBM® *Statistics*) versão 20.0. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Tukey*. Para a Análise da plataforma de força utilizou-se teste de *Friedman* para comparar as semanas, com pós-teste de *Wilcoxon*, para comparação entre os grupos em cada semana foi utilizado *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. Foi adotado o nível de significância de 5% (p<0,05). Ao final do experimento, o pico de força máxima aplicada a plataforma de força durante o treinamento e no decorrer do experimento apresentou resultados estatisticamente significativos para GE e GCOMB, sendo GC o grupo com menor valor. A massa corpórea dos animais de todos os grupos submetidos ao treinamento foi menor que a GCONT. A força máxima de úmero foi estatisticamente significativa (p=0,016), GCOMB > GE (p=0,031) e GC (p=0,037) e GCONT > GE (p=0,031). Foram

observadas diferenças estatisticamente significantes para peso de fêmur ($p=0,001$), sendo: GCOMB > GE ($p < 0,001$) e GC ($p=0,025$) e GCONT > GE ($p=0,049$). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes para força máxima de fêmur ($p < 0,005$), sendo GC > GE ($p < 0,006$). Para as fotomicrografias de úmero foi possível observar massa óssea preservada, e menor espaçamento entre as trabéculas para GCOMB, enquanto para as imagens de fêmur não foi possível observar diferenças nas trabéculas ósseas. Concluimos que o treinamento combinado gera efeitos positivos para a análise da plataforma de força, massa e força máxima de úmero em valores estatisticamente significantes e comprimento, DMO e rigidez relativa de úmero e comprimento de fêmur em valores absolutos, portanto, o treinamento de predominância combinada promoveu benefícios superiores aos ossos quando comparados com o treinamento isolado.

Palavras-chave: Treinamento, Contração Muscular, Ratos, Ossos.

ABSTRACT

BRANCALEON, B.B. **Bone response to training jump, concentric, eccentric and combined. Experimental study of rat bones.** 2017. 99 p. Dissertation (Master) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The objective of this study was to evaluate the effects of free fall training with predominance of eccentric or concentric muscular contraction and a combination of two types of jumps, in the mechanical and morphometric properties of rat bones. Thirty-two female Wistar rats were divided into four groups (n=8). After one week of adaptation to the training protocols, the animals were submitted to eight weeks of training, performing 10 jumps per day, and five days a week. The training protocol consisted of concentric group (CG): 10 jumps at a height of 40cm; Eccentric group (EG): free fall from a height of 35.7cm; Combined group (COMBG): concurrent CG + EG protocol. Control group animals (CONTG) remained in the box for nine weeks without any training. The animals were weighed weekly and the maximum strength data obtained on the force platform (PF) were collected weekly. After the experimental period, the animals were submitted to euthanasia with a lethal dose of anesthetic. The humerus and femur were removed and dissected. Scanning Electron Microscopy (SEM) used the left bones in the qualitative evaluation. The right bones were evaluated for mass (g), length (mm), bone mineral density (BMD) (g / cm²), maximum force (N) and relative rigidity (N / mm). Statistical analysis was performed using the SPSS® program (SPSS® IBM® Statistics) version 20.0. An analysis of variance (ANOVA) one-way was performed with Tukey post-test. For the Analysis of the force platform Friedman's test was performed to compare the weeks, with Wilcoxon's post-test and for comparison between the groups in each week was used Kruskal-Wallis and Dunn post-test. The significance level of 5% (p <0.05) was adopted. At the end of the experiment, the maximum applied force peak (FMA), the force platform during the training, the experiment performance presented statistically significant results for EG, and COMBG, CG being the group with the lowest value. The body mass of the animals of all the groups submitted to the training was smaller than the CONTG. The maximum humerus strength was statistically significant (p = 0.016), COMBG > EG (p = 0.031) and CG (p = 0.037) and CONTG > EG (p = 0.031). Statistically significant differences were observed for femur weight (p = 0.001), being: COMBG > EG (p <0.001) and CG (p = 0.025) and CONTG > EG (p = 0.049). Statistically significant differences were

observed for maximum femoral force ($p < 0.005$), with CG > EG ($p < 0.006$). In photomicrographs of humerus was possible to observe preserved bone mass, and a smaller spacing between trabeculae bone for COMBG, and in femoral images it was not possible to observe differences in trabeculae bone. We conclude that the combined training generates positive effects for the analysis of the force platform, mass and maximum humerus strength in statistically significant values and length, BMD and relative stiffness of humerus and femur length in absolute values, therefore, the combined predominance training. The sum of the jump up and down has promoted superior benefits to the bones when compared with the isolated training.

Keywords: Training, Muscle Contraction, Rats, Bone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem da gaiola que foi utilizada para o experimento.	42
Figura 2: Imagem da caixa confeccionada para o salto dos animais. Parte (A) superior com altura de 15 cm e parte (B) inferior com altura de 25 cm.....	44
Figura 3: Imagem da Plataforma de força, onde foi realizado o treinamento de salto..	45
Figura 4: Imagem do gerador de choque, utilizado no experimento.....	45
Figura 5: Imagem dos aparelhos montados para a realização do treinamento de salto da semana de adaptação.	46
Figura 6: Imagem do esquema representativo de treinamento do grupo concêntrico (GC)	47
Figura 7: Imagem do esquema representativo do treinamento do grupo excêntrico (GE).....	48
Figura 8: Imagem do desenho esquemático que ilustra as regiões de pigmentação de porfirina. As regiões numeradas em 0 são representadas por nenhum depósito de porfirina e 4 para o máximo depósito.	49
Figura 9: Gráfico representa a força aplicada na plataforma de força durante o treinamento do grupo excêntrico. O círculo indica o pico de força durante a aterrissagem/ frenagem do animal, e a seta indica a força peso do animal aplicada na plataforma de força.	50
Figura 10: Gráfico representa a força aplicada na plataforma de força durante o treinamento do grupo concêntrico. A seta indica a força peso do animal aplicada na plataforma de força e o círculo indica o pico de força durante o impulso do salto concêntrico.	51

Figura 11: Gráfico representa a força aplicada na plataforma de força durante o treinamento do grupo combinado. O círculo vermelho indica o pico de força durante o movimento concêntrico (impulso), a seta indica a força peso do animal e o círculo azul indica o pico de força durante o salto com predominância excêntrica de aterrissagem/frenagem) aplicada a plataforma de força.	52
Figura 12: Imagem da balança que foi utilizada para pesar os animais todas as quintas-feiras durante todo o período experimental.	53
Figura 13: Imagem do densitômetro utilizado para a análise de densitometria dos ossos dos animais de pequeno porte do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.....	54
Figura 14: Imagem representativa do Software QDR exclusivo para animais de pequeno porte, com alta resolução do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.....	54
Figura 15: Imagem representativa da balança de precisão (A) e paquímetro digital (B) utilizado para medida dos pesos e comprimentos dos ossos.....	55
Figura 16: Máquina universal de ensaios mecânicos estáticos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.....	56
Figura 17: Úmero preparado e posicionado para realização do a realização do ensaio de flexão de três pontos.	57
Figura 18: Passo a passo da inclusão da distal do fêmur para o ensaio de flexo-compressão, (A) Fêmur dissecado, (B) Distal do fêmur posicionado no molde de silicone para ser incluído com cimento metilmetacrilato e (C) Fêmur pronto.	58
Figura 19: Fêmur posicionado para realização do ensaio de flexão – compressão, com aplicação da força na cabeça femoral.	58

Figura 20: Microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.	59
Figura 21: Pulverizador de ouro do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.	60
Figura 22: Imagem representativa do osso metalizado em ouro, (A) imagem do úmero, (B) imagem do fêmur.	60
Figura 23: Imagem apresenta o comportamento do ganho de massa corporal durante todo o experimento dos I dos 04 grupos experimentais.	64
Figura 24: Gráfico apresenta os valores das massas dos úmeros dos 04 grupos experimentais.	67
Figura 25: Gráfico apresenta os valores de comprimento dos úmeros dos 04 grupos experimentais.	67
Figura 26: Gráfico apresenta os valores de densidade mineral óssea dos úmeros dos 04 grupos experimentais.	68
Figura 27: Gráfico apresenta os valores de força máxima dos úmeros dos 04 grupos experimentais.	69
Figura 28: Gráfico apresenta os valores de rigidez relativa dos úmeros dos 04 grupos experimentais.	70
Figura 29: Fotomicrográfica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 50x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle. O quadro vermelho incide a região (abaixo da epífise proximal) que foi realizado o aumento de 200x.	71

Figura 30: Fotomicrográfica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 200x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle.	72
Figura 31: Gráfico apresenta os valores de massa dos fêmures dos 04 grupos experimentais.	73
Figura 32: Gráfico apresenta os valores de comprimento dos fêmures dos 04 grupos experimentais.	74
Figura 33: Gráfico apresenta os valores de densidade mineral óssea dos fêmures dos 04 grupos experimentais.	75
Figura 34: Gráfico apresenta os valores de força máxima dos fêmures dos 04 grupos experimentais.	75
Figura 35: Gráfico apresenta os valores de rigidez relativa dos fêmures dos 04 grupos experimentais.	76
Figura 36: Fotomicrográfica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 50x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle. O quadro vermelho incide a região (colo femoral) que foi realizado o aumento de 200x.	77
Figura 37: Fotomicrográfica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 200x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle.	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Apresentação dos 04 Grupos Experimentais	43
--	----

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1: Determinada para que o animal tivesse o contato com o solo, uma força de 3,5 vezes o peso corporal.....	48
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Apresenta a massa corpórea média (g) semanal dos 04 grupos experimentais.	63
Tabela 2: Mediana (intervalo de confiança) do pico de força (N) aplicado à plataforma de força durante o treinamento em cada semana. O teste utilizado na análise foi o teste de Friedman e pós-teste de Wilcoxon.	65
Tabela 3: Mediana e intervalo de confiança do pico de força (N) aplicado à plataforma de força dos animais dos 04 grupos experimentais. Os resultados foram avaliados utilizando teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.....	66
Tabela 4: Propriedades do grupo excêntrico (aterrissagem/frenagem).....	94
Tabela 5: Propriedades do grupo concêntrico (impulso)	95
Tabela 6: Propriedades do grupo combinado (Salto com impulso + aterrissagem/frenagem)	96
Tabela 7: Propriedades do grupo controle (animais que permaneceram na caixa sem nenhum tipo de treinamento).....	97

LISTA DE SIGLAS

PTH:	Paratormônio
ATP:	Adenosina trifosfato
MEV:	Microscópio eletrônico de varredura
CIOMS:	International-Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals
COBEA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
PCARP:	Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto
USP:	Universidade de São Paulo
GE:	Grupo Excêntrico
GC:	Grupo Concêntrico
GCOMB:	Grupo Combinado
GCONT:	Grupo Controle
VS:	Versus
FMRP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
DEXA:	Dual-energy X-ray absorptiometry
CPD:	Critical Point Dryer
DMO:	Densidade Mineral óssea

LISTA DE UNIDADES E SÍMBOLOS

±: Mais ou menos

®: Marca registrada

√: Raiz quadrada

™: Trade Mark

%: Porcentagem

°: Graus

°C: Graus Celsius

g: Gramas

s: Segundos

cm: Centímetros

N: Newton

mA: Miliamperes

v: Velocidade no momento do contato com o solo

g: Aceleração da gravidade

h: Altura do salto

Hz: Hertz

mg: Miligrama

kg: Quilograma

mm: Milímetros

kgf: Quilograma Força

kV: Quilovolts

g/cm³: Grama por centímetro cúbico

mg/kg: Miligramas por quilogramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	TECIDO ÓSSEO	30
1.2	PROPRIEDADES MECÂNICAS	31
1.3	REMODELAÇÃO ÓSSEA	32
1.4	LEI DE WOLF.....	32
1.5	AÇÃO MUSCULAR.....	33
1.6	AÇÃO MUSCULAR CONCÊNTRICA E EXCÊNTRICA	34
1.7	EXERCÍCIO DE SALTO	35
2	HIPÓTESE.....	38
3	OBJETIVO.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	ÉTICA EXPERIMENTAL.....	42
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	42
4.3	ALOJAMENTO	42
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
4.5	MATERIAL UTILIZADO PARA OS SALTOS	43
4.6	PLATAFORMA DE FORÇA	44
4.7	ESTÍMULO ELÉTRICO	45
4.8	SEMANA DE ADAPTAÇÃO	46
	<i>4.8.1 Protocolo de treinamento grupo concêntrico</i>	<i>46</i>
	<i>4.8.2 Protocolo de treinamento do grupo excêntrico</i>	<i>47</i>
	<i>4.8.3 Protocolo de treinamento do grupo combinado</i>	<i>48</i>
4.9	PESAGEM DOS ANIMAIS	49
4.10	ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS – AVALIAÇÃO DO ESTRESSE	49
4.11	EUTANÁSIA E COLETA DOS MATERIAIS	49
4.12	ANÁLISES REALIZADAS	50
	<i>4.12.1 Pico de força aplicado na plataforma de força</i>	<i>50</i>

4.13	MASSA CORPÓREA	53
4.14	DENSIDADE MINERAL ÓSSEA.....	53
4.15	MASSA DO OSSO E COMPRIMENTO.....	55
4.16	ENSAIO MECÂNICO	55
4.16.1	<i>Ensaio mecânico de flexão de três pontos</i>	<i>56</i>
4.16.2	<i>Ensaio mecânico de flexo-compressão do colo do fêmur.....</i>	<i>57</i>
4.17	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	59
4.18	ANÁLISE DOS RESULTADOS	61
5	RESULTADOS	63
5.1	ANÁLISE DE ESTRESSE	63
5.2	MASSA CORPORAL.....	63
5.3	PLATAFORMA DE FORÇA	65
5.4	PROPRIEDADES DOS ÚMEROS	67
5.5	PROPRIEDADES DOS FÊMURES	73
6	DISCUSSÃO	80
7	CONCLUSÕES	86
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	88
	APÊNDICE	94
	ANEXO	99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

Segundo Martin; Dempster (1998) o esqueleto tem diversas funções e essas características fornecem uma composição resistente à gravidade.

O tecido ósseo tem como função proteger as vísceras, órgãos vulneráveis (TUREK, 1991), armazenar a homeostase de íons fazendo com que os ossos armazenem e liberem os íons de maneira controlada (MARTIN; DEMPSTER, 1998), o osso proporciona um apoio para os músculos, transformando contrações musculares em movimentos úteis além de funcionar como um sistema que propicia alavancas musculares (GUYTON; HALL, 2006; PORTINHO; BOIN; VERTOLINI, 2008;).

Os principais componentes do tecido ósseo são: os osteoblastos, os osteócitos, células de revestimento ósseo e os osteoclastos, sendo que esses elementos possuem diferenças em relação a sua origem, localização e função (JIANG; JIANG; DAÍ, 2007).

Os osteócitos, são osteoblastos maduros que ficam presos dentro do osso calcificado, já os osteoblastos são células sintetizadoras da matriz óssea ou osteóides que são mineralizados pelo crescimento do cristal em formação. Já os osteoclastos são células multinucleadas que tem como função e princípio reabsorver o osso, removendo os materiais degradados, ou seja, eles promovem a desmineralização do tecido e a degradação do colágeno destruindo o tecido ósseo (FRANCIS; SUTCLIFFE; SCANE, 1998).

Segundo Hollinger¹ et al. (1999 apud SOUSA, 2009) “[...] o osso cortical está localizado na parte externa dos ossos, constitui 80% do esqueleto e é formado por trabéculas que tem a estrutura densa. Já o osso trabecular constitui 20% do esqueleto, sendo formado por trabéculas bem individualizadas com disposição variada, porém interligadas, de modo que os espaços intertrabeculares são ocupados pela medula óssea”.

¹ HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BRUDER, S.P.(1999). **Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy**. In: LYNCH, S.E. GENCO, R.J.; MARX, R.E. Tissue Engineering. Quintessence Publishing Co, Inc.

1.2 Propriedades Mecânicas

Segundo Judas et al.(2012) podemos observar que a resistência mecânica do osso compacto pode chegar a atingir 10 vezes mais do que a do osso esponjoso, sendo que os ossos esponjosos apresentam 20 vezes mais área de superfície por unidade de volume que os ossos compacto, deste modo as suas células podem ser completamente influenciadas pelas células da medula óssea.

É de suma importância o conhecimento das propriedades mecânicas que acontecem no corpo humano, tais como tração, compressão, flexão e torção. Uma vez que ao realizar qualquer movimento o corpo humano, esqueleto e os músculos sustentam e protegem órgãos e vísceras através das propriedades mecânicas (MACEDO, 2016).

Segundo Rho, Kuhn-Spearing e Zioupos (1998) as propriedades mecânicas dos ossos modificam-se em diferentes níveis estruturais. Essas estruturas são divididas e subdivididas em macroestrutura: osso compacto e trabecular. Esses ossos são facilmente diferenciados pelo seu grau de densidade e propriedade, porém o nível de precisão só é confirmado com a avaliação histológica da microestrutura do tecido (GIBSON, 1985).

Para Nordin e Frankel (2003) os ensaios mecânicos nos ajudam a analisar o comportamento do tecido ósseo perante a força externa aplicada sobre ele. Portanto, é possível conseguir uma curva de tensão *versus* deformação que poderá apresentar suas características mecânicas. Através do cálculo realizado em cima de três fases podemos identificar a curva 1) elasticidade: irá apresentar um desempenho linear, ou seja, o material irá se deformar com a força aplicada, porém, quando retirada essa força a tendência é que o material volte as condições normais; 2) transição: esta fase será intermediária entre a fase elástica e a fase plástica e 3) plástica: irá apresentar um característica não linear, ou seja o material irá se deformar com a força aplicada , porém, logo após a retirada da força o material não irá voltar a suas condições originais, ficando assim com a deformação.

Portanto as propriedades mecânicas e suas forças tais como tração, compressão, flexão, cisalhamento, torção e cargas combinadas podem ser aplicadas em ossos íntegros, essas forças ajudam a determinar a rigidez estrutural e a resistência estrutural (carga de ruptura) (VAN DER MEULEN; JEPSEN; MIKIC, 2001).

1.3 Remodelação óssea

O processo de remodelação é considerado um mecanismo de substituição e reconstrução, que preserva a integridade, melhora a função, formação e previne a degradação óssea (JUDAS et al., 2012). O tecido ósseo é uma fonte abundante em fatores de crescimento.

O processo de remodelação óssea irá correr tanto no osso cortical como no trabecular. As principais células envolvidas neste processo são os osteoclastos, os osteoblastos e os osteócitos (EINHORN, 1996).

Essas células respondem a diversos sinais tais como: sinais mecânicos, químicos e estímulos magnéticos. Este procedimento primeiramente ocorre através da ativação das células ósseas, subsequente o local de ativação sofre reabsorção osteoclástica (EINHORN, 1996).

Segundo Najjar², (1977, p. 375-9 apud AMADEI et al., 2006) “[...] logo em seguida ocorre o ciclo de reabsorção, onde secretam proteínas que servirão de substrato para fixação dos osteoblastos”, ocorrendo assim reposição óssea. (EINHORN, 1996).

O processo de reabsorção e formação são interligados, deste modo os fatores humorais locais, e a formação óssea pode exceder a reabsorção durante o processo de crescimento do esqueleto, até atingir a reabsorção levando a formação óssea após o crescimento ósseo (FRANCIS et al., 1998).

Assim o processo fisiológico de remodelação óssea é contínuo, sendo regulada por diversos fatores, tais como: influência hormonal, mecanismo regulatório e fatores locais e externos. E qualquer alteração pode provocar diferentes distúrbios, como por exemplo, a osteoporose (AMADEI et al., 2006).

1.4 Lei de Wolff

Segundo Wolff² (1986 apud HAMMER, 2014) “[...] o estresse mecânico que aplicamos aos ossos acarreta uma mudança na estrutura, atualmente chamada de remodelação óssea, também conhecida como Lei de Wolff”.

² WOLFF, J. **The law of bone remodelling** (trans:Maquet P, Furlong R.). Berlin, 1986. Translated from the 1892 original, *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, by P. Maquet and R. Furlong. Berlin: Springer Verlag

A lei de Wolff “[...] define que o osso tem a capacidade de se adaptar às mudanças de tamanho, forma e estrutura, dependendo dos estresses mecânicos submetidos a esse tecido (WOLFF, 1986 apud HAMMER, 2014)”.

Pode-se dizer que o processo de remodelação óssea é iniciado pela fase de ativação dos osteoclastos, promovendo uma união dos precursores hematopoiéticos com células da espécie osteoblástica, podendo assim ser iniciada por células inflamatórias, particularmente células T (OKUBO, 2017).

1.5 Ação Muscular

A ação muscular é a consequência de uma contração simultânea dos sarcômeros de uma fibra muscular. Esse fenômeno é causado pelo aumento da sobreposição entre o sarcômeros e os miofilamentos, esse meio se dá através das séries de formações e rompimento de pontes de ligação entre filamentos grossos e finos. (EBASHI, 1976).

Para que as pontes de ligação consigam se formar entre os filamentos, a molécula de ATP deverá estar unida à cabeça da miosina, assim formando um complexo que mediará a miosina-ATP. Assim o complexo de formação será capaz de formar ligações com uma subunidade de actina. (POWERS; HOWLEY, 2000). Logo em seguida nas situações de descanso a ligação de miosina à actina serão bloqueadas por moléculas de tropomiosina. Há uma excitação elétrica das fibras musculares devido à liberação de acetilcolina por causa do neurônio motor na placa motora, assim ocorre a liberação de íons de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. A subunidade C ocorre quando os íons de cálcio se ligam à porção da troponina.

Esse fenômeno ocorre quando o cálcio se liga a subunidade C da troponina e faz com que a tropomiosina atrase até o local de interação entre a miosina e a actina (POWERS; HOWLEY, 2000).

Posteriormente a este momento, ocorre um acoplamento mecânico entre a actina e a cabeça da miosina, com este acoplamento entre os filamentos finos e grossos, ainda não ocorrerá há movimentação.

Logo após irá ocorrer o acoplamento excitação-contração, onde ocorre uma sequência de eventos onde um impulso nervoso é gerando e assim um potencial de ação que atingirá a membrana muscular irá gerar o encurtamento muscular através da atividade das pontes cruzadas (POWERS; HOWLEY, 2000).

Para que ocorra a contração muscular irá ocorrer a degradação da ATP pela enzima miosina ATPase (GOLLNICK; SALTIN, 1982).

1.6 Ação Muscular Concêntrica e Excêntrica

A ação muscular se dá através da interação entre miosina e actina no processo de deslizamento entre esses filamentos, levando ao encurtamento dos sarcômeros em uma série (FERREIRA, 2005).

A fonte de energia para a contração necessita de ATP (Adenosina Trifosfato) para produzir a quebra de glicose e glicogênio nas células musculares. Os lipídios e proteínas também podem ser usados para a produção de energia. Em condições de exercício de baixa intensidade ou moderados, ocorre à produção de ATP pelas células musculares onde resultará na utilização de oxigênio ocorrendo o processo aeróbico (SPENCE, 1991).

Durante exercícios de elevada intensidade ocorrerá um aumento do consumo de oxigênio, assim, o oxigênio não irá conseguir de maneira rápida suprir a maioria das fibras musculares. O metabolismo oxidativo não conseguirá produzir toda energia necessária para a contração. O metabolismo que não é necessário o uso contínuo de oxigênio, tem o ATP adicional assim chamado de processo anaeróbico (SPENCE, 1991). Nesse processo ocorre à quebra de glicose e glicogênio para produzir ácido láctico e extravasar para fora das fibras musculares e correntes sanguíneas (SPENCE, 1991).

As ações musculares concêntricas geram um encurtamento das fibras musculares, diminuindo assim o ângulo da articulação (FRY, 2004) assim levando ao encurtamento do músculo durante este processo, ou seja, o músculo irá se contrair e consequentemente vencerá a resistência aproximando as fixações (WEISS; LEHMKUHL, 1997).

No caso das ações musculares excêntricas, estas podem ser classificadas como extensão funcional do músculo, que ocorrem quando o torque realizado pela musculatura acaba sendo menor que a resistência externa, do mesmo modo, ocorre o alongamento da musculatura, igualmente ocorrerá a diminuição da potência de força da musculatura, de tal modo a inserção irá se afastar da origem (FRY, 2004; WEISS; LEHMKUHL, 1997).

Já as ações musculares estáticas ou isométricas acontecem quando o torque realizado pela musculatura é igual ao da resistência externa, gerando assim um estresse onde não ocorrerá o deslocamento angular das articulações envolvidas (FRY, 2004).

1.7 Exercício de Salto

Ações concêntricas e excêntricas promovem diferentes estímulos tanto nos músculos como nos ossos (ROIG; SHADGAN; REID, 2008).

Na literatura, autores como Campoy (2013) e Roig, Shandgan e Reid (2008) relatam que a realização de estímulos excêntricos se destaca em relação aos concêntricos, uma vez que apresentam melhores resultados na musculatura de pacientes com condições crônicas de saúde. Segundo Roig; Shadgan e Reid (2008) e Campoy (2011) quando este tipo de contração é enfatizado em um protocolo de treinamento, há uma hipertrofia muscular, adaptações neurais e um aumento de força muscular. Além disso, constataram que devido aos componentes elásticos presentes no complexo músculo-tendão, durante as ações excêntricas, acontecem um avanço do potencial de produção de força, ocorrendo uma redução do gasto de energia durante a sua realização (CAMPOY, 2011; ROIG; SHADGAN; REID, 2008).

Na literatura há diferentes protocolos, tanto com 10 saltos quanto com 20 saltos por dia com ratos. Umemura et al. (1995) em experimentos realizados com ratos constataram, que se o treinamento for com pelo menos 10 saltos por dia, durante 5 dias na semana este terão ganhos significativos na formação óssea. No estudo experimental de Honda et al. em 2008, em que utilizaram o protocolo de treinamento de 10 saltos por dia durante 5 dias por semana durante 8 semanas, observaram que o treinamento físico durante a juventude e na vida adulta é muito importante para a saúde dos ossos.

Os trabalhos Uemura et al. (1995) e de Honda et al. (2008) avaliaram os efeitos das contrações concêntricas, mas há poucos estudos envolvendo as contrações excêntricas e a prática simultânea, o que podemos chamar de combinados. E principalmente os efeitos destas contrações nas propriedades mecânicas de ossos e em sua morfometria. Para realização das contrações concêntricas, um tipo de treinamento que se pode realizar é o salto (impulso). Neste caso há um impulso realizado pelos membros traseiros do animal. Para se observar os efeitos das

contrações excêntricas, um tipo de treinamento que se pode realizar é o é a queda do animal (aterrissagem/frenagem). Neste caso há uma aterrissagem de maneira simultânea dos membros dianteiros e traseiros.

Os poucos trabalhos na área, nos mostraram que este estudo será importante para a comunidade científica, a fim de realizar o aprimoramento de estudos relacionados ao treinamento físico utilizando saltos (aterrissagem/ frenagem + impulso) e para a fisiologia óssea.

2 HIPÓTESE

H₀: Os treinamentos isolados de salto de predominância excêntrica (queda livre) e de predominância concêntrica (impulso) promovem os mesmos efeitos positivos para o tecido ósseo que o treinamento combinado.

H₁: O treinamento combinado (queda livre + impulso) promove efeitos positivos para o tecido ósseo melhor que os treinamentos isolados.

OBJETIVOS

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do treinamento de queda livre de predominância excêntrica, concêntrica e o combinado, nas propriedades mecânicas e morfométricas de ossos de ratas fisiologicamente normais.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Analisar as forças aplicadas pelas ratas na plataforma de força durante o treinamento de salto.
- ❖ Analisar o ganho de massa das ratas durante o experimento.
- ❖ Avaliar a densidade mineral óssea, dos úmeros e fêmures, de ratas submetidas aos treinamentos de saltos.
- ❖ Analisar as propriedades mecânicas dos ossos por meio de ensaios mecânicos estáticos.
- ❖ Analisar a microarquitetura dos ossos através da Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

MATERIAIS E MÉTODO

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Ética Experimental

Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas descritas pelo *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS), e com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, com o protocolo de aprovação número 192/2014.

4.2 Animais Experimentais

Os animais foram adquiridos junto ao Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto (PCARP) – USP e foram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

4.3 Alojamento

Os animais ficaram alojados em gaiolas coletivas com no máximo 3 animais para cada gaiola (Figura 1), em ambiente calmo e em condições controladas (ciclo 12 horas claro/escuro, umidade relativa de 55-60 % e $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura), os mesmos receberam ração padrão para ratas e água *ad libitum*.

Figura 1: Imagem da gaiola que foi utilizada para o experimento.

4.4 Grupos Experimentais

Foram utilizadas trinta e duas ratas (n=32) ratas fêmeas da raça *Rattus Norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, com massa corpórea entre 200 ± 10 g, adulto-jovens com aproximadamente 38 dias.

O quadro 1 apresenta os 04 grupos experimentais utilizados neste trabalho, com as abreviatura e procedimentos realizados. O período de treinamento para todos os animais foi padronizado em 9 semanas.

Quadro 1: Apresentação dos 04 Grupos Experimentais

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PROCEDIMENTOS
GE	Grupo Excêntrico: Os animais foram submetidos ao treinamento de queda livre (aterrissagem - excêntrica).
GC	Grupo Concêntrico: Os animais foram submetidos ao treinamento de salto (impulso – concêntrico).
GCOMB	Grupo Combinado: Os animais foram submetidos ao treinamento simultâneo de saltos + queda livre (impulso – concêntrico + aterrissagem – excêntrico).
GCONT	Grupo Controle: Os animais permaneceram em gaiola por 9 semanas e não foram submetidos a nenhum treinamento.

4.5 Material utilizado para os saltos

A caixa de madeira adaptada para realização dos treinos de salto foi confeccionada pela Oficina de Precisão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP

A caixa de madeira tem duas partes sendo elas, parte (A) e parte (B). Suas dimensões eram 32 cm de largura x 32 cm de comprimento para ambas as partes, porém a parte (A) superior tinha 15 cm de profundidade e a parte (B) tinha inferiores 25 cm de profundidade, totalizando 40 cm de profundidade.

Figura 2: Imagem da caixa confeccionada para o salto dos animais. Parte (A) superior com altura de 15 cm e parte (B) inferior com altura de 25 cm.

4.6 Plataforma de força

Para analisar as características dos saltos de predominância (concêntrico, excêntrico e combinado) foi utilizada uma plataforma de força adaptada para animais de pequeno porte da marca EMG SYSTEM® do Brasil com célula de carga com capacidade de 50N. Essa plataforma registra os sinais na unidade real de medida (N) e tempo em segundos. A frequência de amostragem é de 240Hz e a armazenagem dos dados podem ser feitas em mídia digital, sendo possível essa visualização em tempo real e após a coleta. A plataforma de força possui dimensões de 30 cm de largura x 30 cm de comprimento x 4 cm de profundidade.

Esta plataforma possui na sua base superior tiras metálicas que conduzem estímulos elétricos quando em contato com as patas do animal que foi submetido ao treinamento. Esses estímulos elétricos foram fornecidos por um gerador de corrente elétrica.

Os dados coletados foram analisados através do *Software Windaq* que forneceu informações relacionadas à força de reação do solo (vertical).

Figura 3: Imagem da Plataforma de força, onde foi realizado o treinamento de salto.

4.7 Estímulo elétrico

O gerador de choque que fornecia estímulos elétricos já descritos nos trabalhos de (OKUBO, 2013; YANAGIHARA, 2014), foi utilizado apenas nos primeiros dias do treinamento de adaptação dos animais do Grupo Concêntrico e Combinado, para aprendizado.

Finalizado o aprendizado os animais realizavam o salto sem a necessidade do estímulo pelo choque, confirmando o aprendizado. Os parâmetros utilizados para a corrente foi de 1,0 mA de tempo a 1,5 s.

Figura 4: Imagem do gerador de choque, utilizado no experimento.

4.8 Semana de Adaptação

Os animais dos grupos excêntrico, concêntrico e combinado realizaram uma semana de adaptação de uma altura de 25 cm para um melhor condicionamento dos animais.

Os animais do grupo excêntrico realizaram a queda livre ocasionando o movimento de aterrissagem/frenagem promovendo o movimento de predominância excêntrica, os animais do grupo concêntrico realizaram o movimento de impulso do salto realizando assim o movimento de predominância concêntrica – impulso do salto e os animais do grupo combinado realizaram o movimento de impulso do salto com uma predominância concêntrica mais a queda livre ocasionando o movimento de aterrissagem/frenagem com uma predominância excêntrica.

Figura 5: Imagem dos aparelhos montados para a realização do treinamento de salto da semana de adaptação.

4.8.1 Protocolo de treinamento grupo concêntrico

O protocolo de treinamento de salto concêntrico consistiu, os animais saltaram 10 vezes ao dia durante 5 dias na semana em um período de 8 semanas. Na fase de adaptação com duração de 1 semana, os animais saltaram de uma altura de 25 cm, e gradativamente essa altura foi aumentada para 40 cm. Após a realização de cada salto o animal era colocado novamente no fundo da caixa, sobre a plataforma de força, para assim terminar a série de 10 saltos.

A estimulação elétrica foi utilizada para o condicionamento dos animais para saltar, realizado apenas quando necessário. Por experiência de trabalhos já realizados no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP (OKUBO, 2013; YANAGIHARA, 2014) a necessidade do estímulo elétrico é somente nos primeiros treinos, depois há um condicionamento do animal a saltar, e muitos animais já são condicionados ao salto e não há necessidade de utilizar nenhum estímulo elétrico.

Figura 6: Imagem do esquema representativo de treinamento do grupo concêntrico (GC). (JU et al., 2014.)

4.8.2 Protocolo de treinamento do grupo excêntrico

O protocolo de treinamento de salto excêntrico consiste em, os animais foram soltos sobre a plataforma de força 10 vezes ao dia durante 5 dias na semana por um período de 8 semanas.

Na fase de adaptação com duração de 1 semana, os animais realizaram a queda livre de uma altura de 25,0 cm, e gradativamente essa altura foi aumentada para 35,7 cm.

A altura da queda livre foi determinada para que o animal tenha, no contato com o solo, uma força de reação de 3,5 vezes o seu peso corporal (PACHECO, 2003; PENONI, 2016). A velocidade no momento do contato com o solo é dada por:

$$v = \sqrt{2 \times g \times h}$$

Equação 2

Onde:

v = velocidade no momento do contato com o solo;

g = aceleração da gravidade

h = altura do salto.

A velocidade no momento do contato com o solo foi associada com a força de reação do solo que foi fornecido no momento da queda, registrada pela plataforma de força.

Figura 7: Imagem do esquema representativo do treinamento do grupo excêntrico (GE)

4.8.3 Protocolo de treinamento do grupo combinado

O protocolo de treinamento simultâneo, os animais saltaram e foram soltos assim respectivamente, na fase concêntrica (impulso do salto) e na fase excêntrica (aterrissagem + frenagem) 10 vezes ao dia durante 5 dias na semana em um período

de 8 semanas. Ocorreu à fase de adaptação com duração de 1 semana, para melhor aprendizado do animal, os animais saltaram de uma altura de 40,0 cm e era solto de uma altura de 35,7cm.

4.9 Pesagem dos animais

Durante todo o período experimental os animais foram pesados semanalmente, para posterior análise.

4.10 Análise clínica dos animais – avaliação do estresse

Os animais foram acompanhados diariamente, sendo observados os aspectos da região prioritária e focinho, assim como sua pelagem.

O estresse do animal era classificado através das regiões numeradas em 0 que era classificado com nenhum depósito de porfirina e 4 com o maior depósito, também era acompanhado diariamente o comportamento do animal.

Figura 8: Imagem do desenho esquemático que ilustra as regiões de pigmentação de porfirina. As regiões numeradas em 0 são representadas por nenhum depósito de porfirina e 4 para o máximo depósito. (FALCAI, 2012).

4.11 Eutanásia e coleta dos materiais

Após o período experimental, os animais foram pesados, e foram submetidos à eutanásia por dose letal de via intramuscular de Xilazina e Ketamina, 10mg/Kg e

90mg/Kg, respectivamente. Assim que os animais foram dissecados e limpos das partes moles para posteriores análises.

4.12 Análises realizadas

4.12.1 Pico de força aplicado na plataforma de força

Foram obtidos os picos de força aplicados a plataforma de força durante o treinamento. Destes valores foram obtidos os maiores picos para cada animal em cada semana de treinamento e estes valores foram utilizados na análise estatística.

O gráfico da Figura 9 apresenta o registro da força peso do animal sobre a plataforma seguido de um pico de força resultante do movimento excêntrico.

Figura 9: Gráfico representa a força aplicada na plataforma de força durante o treinamento do grupo excêntrico. O círculo indica o pico de força durante a aterrissagem/ frenagem do animal, e a seta indica a força peso do animal aplicada na plataforma de força.

A Figura 10 apresenta os dados de força relativos ao salto concêntrico. Durante a realização do salto há um pico de aplicação de força sobre a plataforma e depois o registro da força peso do animal.

Figura 10: Gráfico representa a força aplicada na plataforma de força durante o treinamento do grupo concêntrico. A seta indica a força peso do animal aplicada na plataforma de força e o círculo indica o pico de força durante o impulso do salto concêntrico.

Durante a realização do treinamento combinado é possível observar a formação de picos na plataforma de força, um correspondente ao movimento concêntrico e o segundo ao movimento excêntrico. Entre os dois picos são registrados a força peso do animal sobre a plataforma (Figura 11).

Figura 11: Gráfico representa a força aplicada na plataforma de força durante o treinamento do grupo combinado. O círculo vermelho indica o pico de força durante o movimento concêntrico (impulso), a seta indica a força peso do animal e o círculo azul indica o pico de força durante o salto com predominância excêntrica de aterrissagem/frenagem) aplicada a plataforma de força.

4.13 Massa corpórea

Os animais foram pesados por uma balança, marca C & F, (capacidade: máxima 15 kg, mínima: 125 g e divisão 5g), uma vez por semana durante as 8 semanas de treino, a fim de acompanhar o crescimento dos animais e seu peso.

Figura 12: Imagem da balança que foi utilizada para pesar os animais todas as quintas-feiras durante todo o período experimental.

4.14 Densidade mineral óssea

Os ossos longos do lado direito: Úmeros e Fêmures foram submetidos à análise densitométrica através do densitômetro *marca Lunar*, modelo DPX-IQ Series (USA) (Figura 16), com *software QDR®* (Figura 17) exclusivo para pequenos animais, com alta resolução do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

Para as análises os ossos foram descongelados 24 horas antes e posteriormente os ossos foram retirados das gazes e submersos em um recipiente plástico um a um, contendo soro fisiológico a 2,0 cm de profundidade.

Logo após os ossos foram alinhados e escaneados. As imagens capturadas foram analisadas; estudo cedo. No úmero foi realizada a análise da parte proximal com um quadrado denominado roi, o roi utilizado foi de 0,051cm² para o úmero e colo 0,029cm² para o colo do fêmur.

Figura 13: Imagem do densitômetro utilizado para a análise de densitometria dos ossos dos animais de pequeno porte do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

Figura 14: Imagem representativa do Software QDR exclusivo para animais de pequeno porte, com alta resolução do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

4.15 Massa do osso e Comprimento

Após a realização da densitometria óssea, os ossos foram pesados por uma balança de precisão da marca Marte®, modelo AC-2000, com precisão de 0,001g (Figura 15A). A mensuração do comprimento foi realizada utilizando o paquímetro digital da Marca Mitutoyo®, com precisão de 0,01mm (Figura 15B).

Figura 15: Imagem representativa da balança de precisão (A) e paquímetro digital (B) utilizado para medida dos pesos e comprimentos dos ossos.

4.16 Ensaio Mecânico

Para realização dos ensaios mecânicos foi utilizada máquina universal de ensaios (EMIC® – DL10000) do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP e célula de carga de 500 N.

Os úmeros do lado direito foram submetidos ao ensaio de flexão de três pontos, enquanto que os fêmures direitos foram submetidos ao ensaio de flexo-compressão.

Figura 16: Máquina universal de ensaios mecânicos estáticos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

4.16.1 Ensaio mecânico de flexão de três pontos

Para realizar o ensaio de flexão de três pontos do úmero, foi utilizado o acessório específico. Foi utilizada pré-carga de 5 N e a acomodação de 30 s. A distância entre os dois apoios foi padronizada em 18 mm sendo.

A aplicação da força foi de uma velocidade de 1 mm/min. e no sentido Latero-medial (Figura 17).

Figura 17: Úmero preparado e posicionado para realização do a realização do ensaio de flexão de três pontos.

4.16.2 Ensaio mecânico de flexo-compressão do colo do fêmur

As extremidades distais dos fêmures foram incluídas com resina metilmetacrilato, formando uma base de fixação para manter o paralelismo e alinhamento no ato do ensaio.

Figura 18: Passo a passo da inclusão da distal do fêmur para o ensaio de flexo-compressão, (A) Fêmur dissecado, (B) Distal do fêmur posicionado no molde de silicone para ser incluído com cimento metilmetacrilato e (C) Fêmur pronto.

Para realizarmos o ensaio de flexo-compressão do colo do fêmur, foi utilizado o acessório específico, com uma pré-carga de 5 N e a acomodação de 30 s. A aplicação da força foi de uma velocidade de 0,5 mm/min. na cabeça do fêmur.

Figura 19: Fêmur posicionado para realização do ensaio de flexão – compressão, com aplicação da força na cabeça femoral.

4.17 Microscopia eletrônica de varredura

Para análise da microarquitetura óssea, os úmeros e fêmures do lado esquerdo foram avaliados através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura EVO10, de marca Zeiss®, Do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP (Figura 20). Foram realizados dois cortes no plano coronal e um corte no plano transversal, utilizando serra de marca ISOMET® 1000 com cortes em torno de 2 mm de espessura.

Figura 20: Microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

Os ossos cortados foram submetidos ao preparo específico para análise no microscópio que conste nos seguintes procedimentos: 1) Desidratação em concentrações crescentes de etanol; 2) Secagem em dióxido de carbono líquido em equipamento CPD 030 (Critical Point Dryer, Bal-Tec®, Germany); 3) fixação em suportes de alumínio (*stubs*) com cola condutora à base de prata e grafite para aprimorar o escoamento dos elétrons.

Depois de secos e fixados nos stubs os ossos foram metalizados em ouro (Figura 20), em pulverizador de ouro *Sputter* da marca Bal-Tec (Fürstentum Liechtenstein), modelo SCD 050 Sputter Coater (Figura 21), por 400 s, no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Figura 21: Pulverizador de ouro do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

Figura 22: Imagem representativa do osso metalizado em ouro, (A) imagem do úmero, (B) imagem do fêmur.

Em seguida, os stubs com os ossos foram posicionados no microscópio para que a análise fosse realizada. Para a imagem do úmero como meio de padronização escolhemos logo abaixo da epífise proximal e para o fêmur foi analisada a imagem do colo femoral. Foram utilizadas as seguintes medidas para a melhor imagem no microscópio eletrônico de varredura: Velocidade de varredura foi de 8 vezes, sendo tirada a primeira imagem de 50 vezes e a segunda imagem de 200 vezes. Padronizou-se a obtenção da imagem abaixo da linha epifisária, realizado com o modo de profundidade *OptiBeam = Depht*, com voltagem de 20 kV.

4.18 Análise dos Resultados

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS® (SPSS® IBM® *Statistics*) versão 20.0. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) um fator e pós-teste de *Tukey*. Para a Análise da plataforma de força os dados não apresentaram distribuição normal então se realizou teste de *Friedman* para comparar as semanas, com pós-teste de *Wilcoxon*, para comparação entre os grupos em cada semana foi utilizado *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. Assim foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise de Estresse

Para melhor acompanhamento dos animais foi realizado a análise do estresse que consistiu em observar a região periorbitária, onde não foram encontrados nenhum depósito de porfirina durante o período experimental, também foram observados pelagem, comida, água e comportamento dos animais diariamente e não foi observada nenhuma mudança nestes aspectos durante todo o período experimental.

As tabelas 4, 5, 6 e 7 com as medidas morfométricas, propriedades mecânicas e DMO dos ossos dos 04 grupos experimentais estão apresentadas nos apêndices A, B, C e D, respectivamente.

5.2 Massa Corporal

A tabela 1 apresenta os valores das massas corpórea média dos animais dos 04 grupos experimentais.

Tabela 1: Apresenta a massa corpórea média (g) semanal dos 04 grupos experimentais.

Tempo (semanas)	GE (g)	GC (g)	GCOMB (g)	GCONT (g)
1	245,00 (13,36)	236,25 (18,27)	253,13 (19,07)	255,63 (16,57)
2	262,50 (15,12)	259,38 (34,17)	273,75 (19,04)	285,00 (16,48)
3	283,13 (16,46)	293,75 (24,60)	281,88 (39,55)	299,38 (14,74)
4	292,50 (18,71) ^{a,c}	284,38 (5,63) ^a	311,88 (28,02) ^{b,c}	321,88 (14,87) ^c
5	313,13 (25,06) ^{a,b}	298,75 (6,41) ^a	332,50 (31,51) ^b	333,75 (19,23) ^b
6	327,50 (28,78) ^{a,b}	306,25 (9,16) ^a	346,88 (32,40) ^b	348,13 (17,72) ^b
7	345,63 (23,67) ^{a,b}	318,75 (8,76) ^a	354,38 (33,53) ^b	355,63 (16,57) ^b
8	343,13 (24,92) ^{a,b}	324,38 (9,04) ^a	360,63 (37,55) ^b	366,25 (15,53) ^b

* Letras iguais indicam semelhanças estatísticas na linha.

Não foi observada diferença significativa para massa corpórea na primeira semana ($p=0,118$), segunda semana ($p=0,117$) e na terceira semana ($p=0,473$) entre os grupos experimentais. A partir da 4^a até 8^a semana de treinamento foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais na massa corpórea.

Na 4ª semana foram observadas diferenças significantes ($p=0,001$). O valor da massa dos animais do grupo GC foi menor que o grupo GCONT ($p=0,002$) e GCOMB ($p=0,030$). O grupo GE foi menor que o grupo GCONT ($p=0,019$).

Na 5ª semana foram observados resultados estatisticamente significantes ($p=0,011$). O grupo GC foi menor que GCOMB ($p=0,027$) e GCONT ($p=0,021$).

Na 6ª semana os resultados foram estatisticamente significantes ($p=0,004$). O grupo GC foi menor que GCOMB ($p=0,010$) e GCONT ($p=0,008$).

Na 7ª semana os resultados foram estatisticamente significantes ($p=0,010$). O grupo GC foi menor que GCOMB ($p=0,019$) e GCONT ($p=0,014$).

Na 8ª semana os resultados foram estatisticamente significantes ($p=0,008$). O grupo GC foi menor que GCOMB ($p=0,028$) e GCONT ($p=0,009$).

A figura 25 apresenta o comportamento do ganho de massa durante todo o experimento. Após a semana de adaptação observa-se um aumento da massa corpórea gradativamente.

Figura 23: Imagem apresenta o comportamento do ganho de massa corporal durante todo o experimento dos 1 dos 04 grupos experimentais.

5.3 Plataforma de força

Os resultados dos picos de forças apresentadas na plataforma de força de cada animal não apresentaram distribuição normal. Com isso, para comparação dos resultados entre as semanas foi utilizado o teste de *Friedman*. Para comparar os resultados entre os animais dos 04 grupos experimentais foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*.

Tabela 2: Mediana (intervalo de confiança) do pico de força (N) aplicado à plataforma de força durante o treinamento em cada semana. O teste utilizado na análise foi o teste de Friedman e pós-teste de Wilcoxon.

Semanas	Treinamento
1	1,99 (1,68; 2,19) ^a
2	2,10 (1,80; 2,32) ^{a,b}
3	2,52 (1,99; 2,61) ^{b,c,d}
4	2,50 (2,21; 2,93) ^{b,c}
5	2,68 (2,21; 2,93) ^{c,d}
6	2,93 (2,25; 2,99) ^d
7	2,63 (2,11; 2,74) ^{c,d}
8	2,46 (2,04; 2,50) ^{b,c,d}
P	<0,001

*Letras iguais indicam semelhanças estatísticas.

A tabela 2 apresenta os picos de força dos grupos de treinamento de soltura excêntrico (aterrissagem/ frenagem), o salto concêntrico (impulso e a soma dos dois saltos). Como os animais do grupo controle não realizaram nenhum tipo de treinamento por salto não há valores do pico de força.

Podemos observar um aumento da força aplicada sobre a plataforma a cada semana de treinamento até a 6^a semana e diminui na 7^a e 8^a semana.

Também observamos que apesar de ter ocorrido uma diminui na 7^a e 8^a semana, os valores do pico de força máxima aplicada na plataforma de força ainda foram maiores que as primeiras semanas.

Tabela 3: Mediana e intervalo de confiança do pico de força (N) aplicado à plataforma de força dos animais dos 04 grupos experimentais. Os resultados foram avaliados utilizando teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

Tempo (semanas)	Excêntrico (N)	Concêntrico (N)	Combinado (N)	P
1	2,20(1,96;2,63) ^a	1,12 (0,98;1,38) ^b	1,96(1,76;2,11) ^a	p<0,001
2	2,24(2,04;2,79) ^a	1,19(1,04;1,47) ^b	2,10(1,98;2,24) ^a	p<0,001
3	2,66(2,34;3,13) ^a	1,34(1,26;1,45) ^b	2,21(2,04;2,53) ^c	p<0,001
4	2,69(2,44;3,21) ^a	1,40(1,33;1,54) ^b	2,51(2,32;2,78) ^a	p<0,001
5	2,76(2,48;3,53) ^a	1,41(1,37;1,47) ^b	2,66(2,41;2,92) ^b	p<0,001
6	3,14(2,72;3,59) ^a	1,50(1,23;2,17) ^b	2,61(2,37;2,93) ^a	p=0,002
7	2,83(2,58;3,21) ^a	1,53(1,46;1,64) ^b	2,42(2,18;2,56) ^c	p<0,001
8	2,60(2,34;2,86) ^a	1,49(1,41;1,56) ^b	2,49(2,25;2,80) ^a	p<0,001

*Letras iguais indicam semelhanças estatísticas na linha.

A Tabela 3 apresenta a comparação entre os 03 grupos experimentais onde foram possíveis verificar que o grupo que realizou salto o impulso (concêntrico) apresenta menor força durante o salto que o grupo que realizou queda livre (excêntrico) e o grupo que realizou o treinamento simultâneo (GC + GE - combinado) em todas as semanas do experimento.

Na 3^a e na 7^a semana foi observado que os grupos apresentaram diferenças entre si, e nas demais semanas o GE e o GCOMB apresentaram valores maiores que o GC. Também foi possível observar que GE apresentou até a 6^a semanas valores crescentes e na 7^a a 8^a um valor decrescente, porém ainda assim maior que os demais grupos. GCOMB apresentou até a 5^a semana os valores crescentes, e da 6^a a 8^a semana um valor decrescente, ainda assim maior que GC.

Para o GC foi observado valores crescentes até 7^a semana, e na 8^a semana um valor decrescente.

5.4 Propriedades dos úmeros

Massa Corpórea

A figura 24 apresenta a massa (g) dos úmeros dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 24: Gráfico apresenta os valores das massas dos úmeros dos 04 grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes para a massa do úmero entre os grupos experimentais ($p=0,104$).

A figura 25 apresenta a análise do comprimento dos úmeros dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 25: Gráfico apresenta os valores de comprimento dos úmeros dos 04 grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes para o comprimento do úmero entre os grupos experimentais ($p=0,159$).

A figura 26 Apresenta a densidade mineral óssea (g/cm^2) dos úmeros dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 26: Gráfico apresenta os valores de densidade mineral óssea dos úmeros dos 04 grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes para a DMO do úmero entre os grupos experimentais ($p=0,512$).

A figura 27 apresenta a força máxima (N) dos úmeros dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 27: Gráfico apresenta os valores de força máxima dos úmeros dos 04 grupos experimentais.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes para força máxima de úmero ($p=0,016$), sendo: $GCOMB > GE$ ($p = 0,031$), $GCOMB > GC$ ($p=0,037$), $GCOMB > GCONT$ ($p=0,031$). Além disso, observa-se que GCOMB ($56,00 \pm 7,70$) N foi maior que GE ($50,59 \pm 2,93$) N, maior que GC ($49,29 \pm 5,77$) N e maior que GCONT ($47,81 \pm 5,32$) N.

A figura 28 apresenta a rigidez relativa (N/mm) dos úmeros dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 28: Gráfico apresenta os valores de rigidez relativa dos úmeros dos 04 grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes para a rigidez do úmero entre os grupos experimentais ($p=0,273$).

Microscopia eletrônica de Varredura

As fotomicrografias com aumento de 50x do úmero abaixo da epífise proximal, obtidas a partir de MEV são apresentadas na figura 29.

Figura 29: Fotomicrográfrica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 50x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle. O quadro vermelho incide a região (abaixo da epífise proximal) que foi realizado o aumento de 200x.

As fotomicrografias com aumento de 200x do úmero abaixo da epífise proximal, obtidas a partir de MEV são apresentadas na figura 30.

Figura 30: Fotomicrografia obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 200x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle.

A figura 30 apresenta uma imagem ampliada de um corte do úmero de rata submetido aos treinamentos, podemos observar que o grupo simultâneo (GCOMB), apresentou uma massa óssea mais preservada e menor espaçamento entre as trabéculas que os demais grupos experimentais.

5.5 Propriedades dos Fêmures

A figura 31 apresenta as médias e os desvios padrão das massas (g) dos fêmures direitos dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 31: Gráfico apresenta os valores de massa dos fêmures dos 04 grupos experimentais.

Na análise dos resultados das massas dos fêmures mostrou que houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$). Os valores médios das massas dos fêmures dos 04 grupos experimentais foram: GCOMB ($1,47 \pm 0,12$) g, GCONT ($1,36 \pm 0,10$) g, GC ($1,24 \pm 0,15$) g e GE ($1,16 \pm 0,18$) g. As seguintes comparações entre os grupos foram observadas diferenças estatisticamente significantes: GCOMB > GE ($p < 0,001$); GCOMB > GC ($p = 0,025$) e GCONT > GE ($p = 0,049$).

A figura 32 apresenta as médias e os desvios padrão dos comprimentos dos fêmures dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 32: Gráfico apresenta os valores de comprimento dos fêmures dos 04 grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes para o comprimento do fêmur entre os grupos experimentais ($p=215$).

A figura 33 apresenta as médias e desvios padrão das densidades minerais ósseas (g/cm²) dos fêmures dos 04 grupos experimentais.

Figura 33: Gráfico apresenta os valores de densidade mineral óssea dos fêmures dos 04 grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes para DMO do colo do fêmur entre os grupos experimentais ($p=0,185$).

A figura 34 apresenta as médias e desvios padrão das forças máximas dos fêmures dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 34: Gráfico apresenta os valores de força máxima dos fêmures dos 04 grupos experimentais.

Na análise dos resultados das forças máximas dos fêmures foi observado houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$). Na comparação entre o grupo concêntrico GC ($133,81\pm15,52$) N e excêntrico GE($108,59\pm12,02$) N, houve diferença estatística significativa ($p=0,006$). Em valor absoluto observa-se que a força máxima do grupo concêntrico foi maior que todos. Os valores médios das forças máximas dos grupos controle e combinados foram: CONT ($125,48\pm12,29$) N e GCOMB ($114,18\pm11,02$) N, respectivamente.

A figura 35 apresenta as médias e desvios padrões da rigidez relativa (N/mm) dos fêmures dos animais dos 04 grupos experimentais.

Figura 35: Gráfico apresenta os valores de rigidez relativa dos fêmures dos 04 grupos experimentais.

Na comparação dos resultados, não foi observada nenhuma diferença estatística significativa entre os 04 grupos experimentais ($p=0,315$).

Microscopia eletrônica de varredura

A figura 36 apresenta as fotomicrografias obtidas no MEV da região proximal dos fêmures dos animais dos 04 grupos experimentais, sendo, para o aumento de 50x, as figuras apresentadas são: GE, GC, GCOMB e GCONT.

Figura 36: Fotomicrográfica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 50x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle. O quadro vermelho incide a região (colo femoral) que foi realizado o aumento de 200x.

Os quadrados marcados em vermelho mostram as regiões ampliadas com aumento de 200x, as figuras apresentadas são: GE, GC, GCOMB e GCONT.

As fotomicrografias com aumento de 200x da região proximal do fêmur, obtidas a partir de MEV são apresentadas na figura 37.

Figura 37: Fotomicrográfrica obtida em Microscopia eletrônica de varredura no aumento de 200x, as figuras mostram: (GE) - Grupo Excêntrico; (GC) - Grupo Concêntrico; (GCOMB) - Grupo Combinado e (GCONT) - Grupo Controle.

A figura 37 apresenta a imagem ampliada de um corte da região proximal do fêmur dos 04 grupos experimentais submetidos aos treinamentos, onde, não foi possível observar diferenças significativas nas trabéculas ósseas.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos das diferentes formas de saltos dentro de uma caixa, realizados por ratas, nas propriedades mecânicas e morfométricas dos ossos envolvidos.

Os trabalhos de Umemura et al. (1995), Honda et al. (2008) e de Okubo et al. (2017), realizaram treinamento de predominância concêntrica, onde há uma contração concêntrica dos músculos, a fim de verificar os efeitos nos ossos dos membros traseiros. Neste trabalho, além dos efeitos dos saltos de predominância concêntrica (impulso), foram avaliados os efeitos dos saltos de queda livre – excêntrico (aterrissagem/frenagem), e o treinamento simultâneo (combinado).

Os valores dos picos de força observados na plataforma de força dos animais do grupo com predominância concêntrica (GC) foram menores que os valores dos demais grupos. Isto aconteceu devido ao salto de predominância concêntrica (GC – impulso) sofrer uma atuação principalmente dos membros traseiros, com impulso controlado pelo animal. No treinamento com predominância excêntrica (GE – aterrissagem/frenagem) foi possível observar que a energia potencial associada ao animal na parte superior da caixa é transformada em energia cinética durante o salto, pela ação da gravidade, e energia de impacto, no momento em que o animal atinge a plataforma. No momento que o animal aterrissa na plataforma ele realiza a contração de predominância excêntrica, porém não controla a força aplicada na plataforma como visto no movimento concêntrico.

Uma vez que a energia potencial, observada antes da queda livre de predominância excêntrica, e após o salto de predominância concêntrico, está diretamente relacionada a massa corporal de cada animal, se esperava que nas últimas semanas de treinamento ocorressem os maiores picos de força máxima aplicada a plataforma de força, porém não foi observado esse fato.

O crescimento dos picos de forças em geral ocorreu até a 6ª semana para os animais dos grupos GE e GCOMB e depois mantiveram-se constante da 7ª e 8ª semana, já para o GC o pico de força manteve-se até a 7ª e logo após ocorreu um pequeno decréscimo. Provavelmente, pode ter ocorrido uma adaptação melhor dos animais do grupo GC ao treinamento junto com a diminuição proporcional no ganho de massa.

Os animais do grupo (GE) apresentaram maior força para realização do salto, seguido do combinado durante o movimento excêntrico. Essa maior força pode ter gerado um estresse no osso, que acabou diminuindo a sua resistência mecânica como observado nos valores encontrados no ensaio mecânico do fêmur, em que o grupo excêntrico apresentou menores valores de força máxima e o grupo combinado mostrou valores intermediários.

Na literatura é possível observar um maior número de estudos que analisam o efeito do salto de predominância concêntrica (JU et al.; 2012; VAL et al.; 2013; YANAGIHARA et al., 2016), do que aqueles que avaliam o efeito da queda livre ou de predominância excêntrica (JU et al., 2014).

Trabalhos como VAL et al. (2013) corroboram com os nossos achados, os autores estudaram o efeito de protocolos de treinamento de alto impacto com frequências e períodos diferentes sobre propriedades mecânicas de ossos de ratas e concluíram que, mesmo com uma frequência menor de treinamento de salto vertical (de predominância concêntrica), estes possuíam efeitos positivos no tecido ósseo.

Yanagihara et al. (2016) estudaram o efeito do treinamento com salto em ratas com osteopenia causada pela inatividade e concluíram que o treinamento antes do período de inatividade pode impedir a instalação da osteopenia. Assim nosso estudo trouxe um diferencial nos trabalhos com animais de pequeno porte utilizando diferentes tipos de ação muscular.

O principal diferencial do estudo foi à comparação entre a ação muscular excêntrica e concêntrica. Uma vez que foi possível observar que a força de reação no solo e na fisiologia da contração muscular do movimento de predominância excêntrico é maior que a do movimento de predominância concêntrico (HOUGLUM; BERTOTI, 1997). E que essa diferença de força de reação provoca diferentes respostas do tecido ósseo. Para Houglum e Bertoti (1997) a ação muscular excêntrica gera uma maior tensão nas fibras musculares que ações musculares concêntricas. Assim, essa tensão pode passar para os ossos no momento da aterrissagem/ frenagem no movimento. É possível observar, na literatura, os benefícios que o exercício e o treinamento físico proporcionam, dentre eles a melhora na DMO, diminuição do risco de doenças

crônicas - degenerativas e principalmente benefícios cardiorrespiratórios (ANTUNES et al., 2006).

Welch, Weaver e Turner (2004) estudaram os efeitos do treinamento de queda livre em ratas em crescimento, e concluíram que o treinamento de aterrissagem promove uma melhora na densidade e resistência óssea independente da altura, a partir de 30 cm, o que contradiz os resultados do presente estudo, uma vez que observamos diminuição da força máxima em GE (aterrissagem/frenagem) a partir de 35,7 cm.

Os resultados das propriedades biomecânicas de úmero mostraram que a força máxima foi estatisticamente diferente, apesar da massa, comprimento, DMO e rigidez relativa de úmero não terem se apresentado diferenças significantes. Entretanto, podemos observar que em valores absolutos o GCOMB apresentou melhores resultados comparado com os demais grupos, dado este que pode ser observado qualitativamente nas imagens de microscopia eletrônica de varredura em que é possível observar menor espaçamento entre trabéculas. Este resultado pode ter ocorrido devido à associação de duas forças (excêntrica e concêntrica), pois quando o animal saltava (impulso) posteriormente ele segurava com o membro torácico na borda da caixa de madeira e logo após o animal era solto (aterrissagem/frenagem).

Apesar de não apresentar diferenças estatísticas a DMO do colo do fêmur de GCOMB, em valores absolutos, prevaleceram em relação aos demais grupos. Do mesmo modo, o valor da massa do fêmur apresentou resultados estatisticamente significativos onde o GCOMB apresentou melhores resultados comparado aos demais grupos experimentais. Acreditamos que os valores não foram estatisticamente significativos devido à tensão que o GCOMB tem através da associação duas forças aplicadas (excêntrica + concêntrica). Muitas vezes, quando ocorre uma elevação na DMO não significa que a resistência mecânica também estará elevada. Em algumas patologias, como por exemplo, a osteopetrose, a densidade óssea é tão elevada que o osso se torna mais frágil (SOBACCHI, 2013).

O estudo de Wu et al. (1998) avaliaram ginastas que saltaram utilizando a perna esquerda para a (aterrissagem/frenagem) e a perna direita para o (impulso). Eles observaram que a perna que realizou o impulso teve melhores resultados de DMO

comparada com a perna que realizou a (aterrissagem/ frenagem). Esse estudo conclui que a força vertical de reação do solo durante o impulso foi maior que na aterrissagem/frenagem. Os resultados de Wu et al. (1998) corroboram com nossos achados para força máxima de fêmur onde a ação de predominância concêntrica prevalece a ação de predominância excêntrica. Uma possível mudança na DMO no grupo excêntrico poderia ser justificada por uma maior massa corpórea, Entretanto, não observamos esse resultado neste estudo.

O estudo de Colliander e Tesch (1991) avaliaram 14 mulheres e 14 homens com dor no joelho e a resposta da ação muscular excêntrica e concêntrica em relação a força funcional, velocidade angular e morfologia do músculo esquelético. Eles concluíram que o aumento no pico de torque e parâmetros relacionados ao desempenho da força foi devido à combinação das forças musculares (excêntrica e concêntrica) comparado ao treinamento isolado. Essa conclusão pode ser justificada devido ao treinamento de curto prazo e especialmente, a união de duas forças e a adaptação neural.

O'Hagan et al. (1995) compararam o treinamento com peso e de acomodação e concluíram que ambos os exercícios, concêntricos e excêntricos, promovem um aumento da força muscular. Entretanto, o treinamento com pesos pode ter um efeito mais eficaz para o aumento da massa muscular, assim corroborando com os achados deste trabalho onde o treinamento combinado foi melhor que os demais.

A plataforma é um instrumento muito versátil e já é muito utilizado em estudos e avaliações com humanos, mas em animais de pequeno porte ainda há poucos trabalhos realizados. Neste trabalho foi utilizado uma plataforma de força para a avaliação dos saltos ratos com treinamento de queda livre de predominância excêntrica. Devido aos poucos trabalhos realizados que utilizaram a plataforma de força com animais de pequeno porte houve dificuldade em comparar os resultados encontrados com os da literatura.

Penoni (2016) avaliou os efeitos do treinamento de queda livre (excêntrico) em ossos de ratas submetidas a um novo modelo de indução à perda óssea. Foi observado que o treinamento de impacto através da queda livre ou (excêntrico) não resultou em benefícios para DMO e para o ensaio mecânico dos úmeros e tíbias dos animais. Já no nosso estudo o treinamento trouxe benefícios para os animais que

fizeram uma combinação de salto com predominância excêntrica combinado com a concêntrica.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ❖ A utilização da plataforma de força foi capaz de realizar as medidas das forças de reação dos saltos de predominância excêntrico, concêntrico e combinado.
- ❖ O tipo de treinamento influencia no ganho de peso, com menor peso observado no treinamento de salto com predominância concêntrico.
- ❖ O tipo de salto não influenciou a densidade mineral óssea para o membro dianteiro e traseiro.
- ❖ O tipo de treino interfere de forma diferente na força máxima de membros dianteiros e traseiros uma vez que foram observados maiores valores para membros dianteiros no treinamento combinado e nos membros traseiros no treinamento concêntrico.
- ❖ Qualitativamente, as análises por Microscopia eletrônica de varredura para o membro dianteiro mostraram que houve uma preservação da massa óssea e menor espaçamento entre as trabéculas para os ossos dos animais do grupo controle, já para o membro traseiro não foi possível observar diferenças nas áreas das trabéculas ósseas.
- ❖ O treinamento de salto com predominância combinado promoveu propriedades mecânicas superiores aos ossos quando comparados com os demais treinamentos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 5–12, 2006.

ANTUNES, H. K. M. et al. Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p. 108–114, 2006.

CAMPOY, F. A. S. **Efeitos do treinamento resistido concêntrico vs excêntrico sobre parâmetros clínicos e funcionais**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Presidente Prudente, 2011.

CIONS. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. **The National Academies**, 1985.

COLLIANDER, E. B.; TESCH, P. A. Responses to eccentric and concentric resistance training in females and males. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 141, n. 2, p. 149–56, 1991.

EBASHI, S. Excitation-contraction. **Annual Review of Physiology**, v. 36, n. 49, p. 293–313, 1976.

EINHORN, T.A. The Bone Organ System: Form and Function. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press. (1996)

FALCAI, M. J. et al. A Modified Technique of Rat Tail Suspension for Longer Periods of Observation. **Aviation Space and Environmental Medicine**. v. 83, n. 12, p. 1176–1180, 2012.

FERREIRA, A. T. Physiology of muscular contraction. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 3, p. 60–62, 2005.

FRANCIS, R. M.; SUTCLIFFE, A.M.; SCANE, A. C. Pathogenesis of osteoporosis. STEVENSON, J, C.; LINDSAY, R. **Osteoporosis. Chapman & Medical**, p-28. (1998).

FRY, A. C. The role of resistance exercise intensity on muscle fiber adaptation. **Sports Medicine**. v. 34, n. 10, p. 663-679, 2004.

GIBSON, L. J. The mechanical behaviour of cancellous bone. **Journal of Biomechanics**, v. 18, n. 5, p. 317–328, 1985.

GOLLNICK, P.; SALTIN, B. Significance of skeletal muscle oxidative enzymes enhancement with endurance training. **Clinical Physiology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 1982.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 11^a ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2006.

HAMMER, A. The paradox of Wolff's theories. **The Irish Journal of Medical Science**, v. 184, n. 1, p. 13–22, 2014.

HONDA, A. et al.. Bones benefits gained by jump training are preserved after detraining in young and adult rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 3, p. 849–853, 2008.

HOUGLUM, P. A.; BERTOTI, D. B. **The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement**. 6. ed. São Paulo: Manole, 740 p. 2015.

JIANG, S. D.; JIANG, L. S.; DAI, L. Y. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo**. 2012. 51f. Monografia. Universidade de Ortopedia dos HUC CHUC da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

JU, Y. I. et al. Differential effects of jump versus running exercise on trabecular

architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 766–72, 2012.

JU, Y. I. et al.. Effects of different types of jump impact on trabecular bone mass and microarchitecture in growing rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–8, 2014.

MACEDO, A. P. et al. Influence of treadmill training on bone structure under osteometabolic alteration in rats subjected to high-fat diet. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 27, n. 2, p. 167–1768, 2016.

MARTIN, T.J.; DEMPSTER, D.W. Bone structure and Cellular Activity. In: STEVENSON, J, C.; LINDSAY, R. **Osteoporosis. Chapman & Medical**, p-28. (1998).

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema musculoesquelético**. 3º ed.: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

O'HAGAN, F. T. et al.. Comparative effectiveness of accommodating and weight resistance training modes. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1210–1219, 1995.

OKUBO, R. **Efeitos do exercício de alto impacto em ossos osteopênicos : Estudo experimental em ratas ovariectomizadas**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

OKUBO, R. et al. Jumping exercise preserves bone mineral density and mechanical properties in osteopenic-ovariectomized rats even following established osteopenia. **Osteoporosis International**, DOI: 10.007/s00198-017-3905-7, 2017.

PACHECO, I. **O efeito da carga compressiva repetitiva sobre a placa de crescimento. Estudo experimental em ratos**. 2003. 117f. Tese (Doutorado em Ciências do Movimento). Espaço de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.2003.

PENONI, O. A. C. **Proposta de um modelo de suspensão de corpo inteiro para indução de osteopenia e avaliação do treinamento de queda livre (excêntrico) nos ossos de ratas**. 2016. 101f. Tese (Doutorado em Ciências).Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 408–411, 2008.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício. Teoria e aplicações ao condicionamento e ao desempenho**. 3ª ed. Barueri: Manole. 2000.

RHO, J.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v. 20, p. 92–102, 1998.

ROIG, M.; SHADGAN, B.; REID, W. D. Eccentric exercise in patients with chronic health conditions: a systematic review. **Physiotherapy Canada**, v. 60, n. 2, p. 146–160, 2008.

SOBACCHI, C. et al. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 9, p. 522–536, 2013.

SOUSA, T. H. S. **Projeto conceitual de implantes bioativo com gradiente de estrutura em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita. Análises: in vitro e in vivo**. 2009. 152f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.

SPENCE, A. P. **Anatomia humana básica**. 3ª ed. São Paulo. Manole,1991.

TUREK. S. L. Ortopedia: principios e sua aplicação. 1ª ed. Manole, 1991.

VAL, F. F. A. et al. Efeito de regimes de treinamento físico de alto impacto nas propriedades mecânicas de ossos: estudo experimental em ratas wistar. **Revista**

Brasileira de Medicina do Esporte, v. 19, n. 4, p. 252–255, 2013.

VAN DER MEULEN, M.; JEPSEN, K. J.; MIKIC, B. Understanding bone strength: size isn't everything. **Bone**, v. 29, n. 2, p. 101–104, 2001.

UMEMURA, Y. et al. Effects of jump training on bone hypertrophy in young and old rats. **International Journal Sports Medicine**, Japan. v. 16, n. 6, p. 364-367, 1995.

UMEMURA, Y.; SOGO, N.; HONDA, A. Effects of intervals between jumps or bouts on osteogenic response to loading. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, p. 1345–1348, 2002.

UMEMURA, Y. et al. High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 456–460, 2008.

WEISS, K. E. L.; LEHMKUHL, I. D. Cinesiologia Clínica de Brunnstrom. 5ª ed. Texas. Manole. 1997.

WELCH, J. M.; WEAVER, C. M.; TURNER, C. H. Adaptations to free-fall impact are different in the shafts and bone ends of rat forelimbs. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 5, p. 1859–1865, 2004.

WU, J. et al. The side-to-side differences of bone mass at proximal femur in female rhythmic sports gymnasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 900–6, 1998.

YANAGIHARA, G. R. **Resposta do tecido ósseo ao treinamento de alto impacto. Estudo experimental em ratas submetidas ao modelo de suspensão pela cauda**. 2014. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014.

YANAGIHARA, G. R. et al. High-impact exercise in rats prior to and during suspension can prevent bone loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 3, p. 1–8, 2016.

APÊNDICE (A)

Tabela 4: Propriedades do grupo excêntrico (aterissagem/frenagem)

Grupo	Número de Animais	Massa de úmero	Comprimento	DMO	Força Máxima	Rigidez Relativa	Massa de fêmur	Comprimento	DMO do colo do Fêmur	Força Máxima	Rigidez Relativa
Excêntrico	1	0,51	2,80	0,13	50,37	112,83	1,39	3,48	0,15	100,22	151,47
Excêntrico	2	0,48	2,77	0,14	50,06	128,63	1,38	3,45	0,18	113,07	148,89
Excêntrico	3	0,49	2,75	0,15	51,02	128,24	1,00	3,38	0,14	99,74	200,10
Excêntrico	4	0,47	2,83	0,17	53,12	123,79	0,98	3,34	0,15	110,58	112,15
Excêntrico	5	0,49	2,96	0,12	49,92	118,04	1,08	3,52	0,17	98,32	129,111
Excêntrico	6	0,44	2,59	0,15	49,65	115,39	1,01	2,93	0,16	98,44	137,72
Excêntrico	7	0,59	2,87	0,16	55,37	136,56	1,11	3,43	0,16	132,66	102,92
Excêntrico	8	0,44	2,70	0,11	45,21	104,15	1,35	3,52	0,13	115,7	152,21

APÊNDICE (B)

Tabela 5: Propriedades do grupo concêntrico (impulso)

Grupo	Número de Animais	Massa de úmero	Comprimento	DMO	Força Máxima	Rigidez Relativa	Massa de fêmur	Comprimento	DMO do colo do Fêmur	Força Máxima	Rigidez Relativa
Concêntrico	1	0,58	2,80	0,14	44,07	106,99	1,29	3,49	0,18	141,27	154,00
Concêntrico	2	0,49	2,78	0,13	46,79	136,29	1,09	3,41	0,13	161,02	172,10
Concêntrico	3	0,48	2,83	0,16	54,21	132,44	1,27	3,41	0,12	150,39	113,90
Concêntrico	4	0,50	2,83	0,15	47,69	126,68	1,22	3,28	0,19	116,54	195,40
Concêntrico	5	0,46	2,80	0,11	45,23	122,62	1,16	3,43	0,13	124,86	266,40
Concêntrico	6	0,48	2,78	0,14	44,51	103,24	1,46	3,35	0,17	121,12	153,20
Concêntrico	7	0,62	2,86	0,13	60,67	140,39	1,04	3,39	0,19	127,54	173,90
Concêntrico	8	0,56	2,70	0,17	51,18	141,13	1,41	3,43	0,16	127,70	178,40

APÊNDICE (C)

Tabela 6: Propriedades do grupo combinado (Salto com impulso + aterrissagem/frenagem)

Grupo	Número de Animais	Massa de úmero	Comprimento	DMO	Força Máxima	Rigidez Relativa	Massa de fêmur	Comprimento	DMO do colo do Fêmur	Força Máxima	Rigidez Relativa
Combinado	1	0,50	2,91	0,12	49,90	129,78	1,41	3,38	0,12	115,55	151,02
Combinado	2	0,45	2,70	0,16	44,72	95,03	1,31	3,31	0,17	130,52	169,92
Combinado	3	0,54	2,86	0,18	68,26	178,27	1,41	3,65	0,12	131,08	253,28
Combinado	4	0,56	3,05	0,08	63,77	155,03	1,53	3,41	0,15	104,25	162,74
Combinado	5	0,49	2,81	0,11	50,60	120,58	1,62	3,51	0,14	107,92	121,87
Combinado	6	0,49	2,94	0,17	54,65	131,35	1,50	3,34	0,17	112,49	129,64
Combinado	7	0,49	2,88	0,20	58,14	107,01	1,36	3,50	0,10	108,62	155,79
Combinado	8	0,61	2,93	0,17	57,95	146,85	1,63	3,51	0,12	103,01	146,31

APÊNDICE (D)

Tabela 7: Propriedades do grupo controle (animais que permaneceram na caixa sem nenhum tipo de treinamento)

Grupo	Número de Animais	Massa de úmero	Comprimento	DMO	Força Máxima	Rigidez Relativa	Massa de fêmur	Comprimento	DMO do colo do Fêmur	Força Máxima	Rigidez Relativa
Controle	1	0,55	2,50	0,12	44,09	142,48	1,37	3,56	0,17	130,61	208,11
Controle	2	0,59	2,84	0,14	52,90	148,15	1,16	3,45	0,12	135,40	111,03
Controle	3	0,60	2,89	0,13	51,72	147,48	1,34	3,10	0,16	138,59	184,50
Controle	4	0,63	2,81	0,16	47,81	115,68	1,53	3,02	0,09	138,70	229,50
Controle	5	0,51	2,85	0,11	36,69	101,16	1,40	3,41	0,14	108,88	191,80
Controle	6	0,47	2,47	0,13	47,44	108,44	1,33	2,94	0,14	122,28	151,90
Controle	7	0,54	2,82	0,11	51,02	129,23	1,37	3,42	0,13	108,85	139,00
Controle	8	0,54	2,77	0,15	50,77	140,97	1,37	3,36	0,09	120,54	179,90

ANEXO – Aprovação do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 192/2014, sobre o projeto intitulado “Resposta do tecido ósseo ao treinamento de salto concêntrico, excêntrico e combinado. Estudo experimental em ossos de ratas”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Antonio Carlos Shimano** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 31 de agosto de 2015.

We certify that the protocol n° 192/2014, entitled “Bone tissue response to concentric, eccentric and combined jump training. Experimental study on bones of rats”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/31/2015.

Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)3335-3301