UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

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

ADRIANA VALADARES DA SILVA

**Avaliação da qualidade óssea da tíbia de ratas submetidas à
hipoatividade através da suspensão pela cauda e tratadas com
exercícios de natação**

Ribeirão Preto

2014

ADRIANA VALADARES DA SILVA

**Avaliação da qualidade óssea da tíbia de ratas submetidas à
hipoatividade através da suspensão pela cauda e tratadas com
exercícios de natação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Adriana Valadares

Avaliação da qualidade óssea da tíbia de ratas submetidas à hipoatividade através da suspensão pela cauda e tratadas com exercícios de natação. Ribeirão Preto, 2014.

108 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor Orientador: Volpon, José Batista.

1.Tecido ósseo. 2.Suspensão pela cauda. 3.Osteopenia 4.Natação. 5.Propriedades mecânicas. 6.Histomorfometria. 7.Densidade Óssea.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Silva, Adriana Valadares da

Título: Avaliação da qualidade óssea da tíbia de ratas submetidas à hipoatividade através da suspensão pela cauda e tratadas com exercícios de natação

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus filhos,

Ariane e **Tiago**, a quem dedico todo meu amor, vocês são a alegria da minha vida, meu maior tesouro.

Ao meu marido,

Márcio, com muito carinho, pelo amor, compreensão e incentivo.

Aos meus pais,

Laercio e **Elza**, por estarem comigo em todos os momentos da minha vida.

A toda minha família, pela amizade, apoio e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por seu olhar misericordioso sobre minha vida em todos os momentos.

Em especial ao **Prof. Dr. José B. Volpon**, pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, pelos ensinamentos e valioso exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos **Prof. Dr. João Paulo Issa**, pela amizade, disponibilidade e auxílio nas análises histológicas realizadas nesse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada** pela contribuição nas análises da densitometria óssea.

Aos amigos **Bruna Gabriela Kotake**, pelo auxílio na confecção das análises histológicas, e **Mauricio Falcai**, pela ajuda e contribuição durante a fase experimental.

A amiga **Ana Paula Macedo**, pelos momentos de estudos, companherismo e trocas de experiências e também aos amigos **Jorge Caolo Imori Jr.**, **Ariane Zamarioli** e **Rodrigo Okubo**.

Aos funcionários do Laboratório: **Terezinha**, pela amizade sincera; **Francisco** e **Luiz Henrique**, pelo auxílio na fase experimental e amizade inestimável e aos demais funcionários.

A secretária do Programa de pós-graduação Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da FMRP-USP **Rita de Cássia S. Cossalter**, pela atenção e orientação prestadas durante a conclusão do doutorado.

Aos amigos do Curso Superior de Graduação de Fisioterapia da Universidade de Franca pelo incentivo na realização deste trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos

RESUMO

RESUMO

Silva AV. **Avaliação da qualidade óssea da tíbia de ratas submetidas à hipoatividade através da suspensão pela cauda e tratadas com exercícios de natação** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014.

O osso requer que alguns de seus elementos detectem estímulos mecânicos e os transformem em sinais celulares adequados para que o tecido ósseo possa manter a eutrofia e adaptar-se às solicitações mecânicas a que é submetido. Assim, a estrutura óssea pode torna-se mais resistente quando a demanda mecânica aumenta e, da mesma forma, menos resistente em condições de hipoatividade como imobilizações, sequelas motoras, repouso prolongado ou em ambientes de microgravidade como as experimentadas por astronautas. Dessa interação podem resultar ossos com massa diminuída, o que caracteriza situações de osteopenia ou osteoporose. Uma das indicações do exercício de natação é estimular e manter o trofismo do tecido ósseo. No entanto, a relação entre natação e qualidade óssea em pessoas com osteopenia, não foi suficientemente estudada de forma a embasar recomendações clínicas. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a eficácia da natação na recuperação da qualidade óssea avaliada em tíbias de ratas com osteopenia induzida por suspensão dos membros posteriores. Foram utilizadas 50 ratas da raça Wistar divididas em cinco grupos experimentais ($n=10/\text{grupo}$); dois controles e três experimentais. Houve um grupo suspenso pela cauda durante 21 dias consecutivos (S) e seu controle que permaneceu em gaiolas comuns pelo mesmo período (CI). No grupo suspenso e treinado os animais permaneceram em suspensão durante 21 dias, e depois foram submetidos a 20 sessões de natação (ST). No grupo suspenso não treinado os animais foram suspensos por 21 dias e soltos em gaiolas comuns por 30 dias (SNT). No grupo controle II as ratas foram observadas em gaiolas comuns por 51 dias, sem intervenção (CII). A avaliação da qualidade óssea foi feita pela densitometria (DXA) e ensaio mecânico realizados na tíbia direita e histomorfometria da região metafisária proximal da tíbia esquerda. Para análise estatística todos os valores foram considerados diferentes significativamente em $p<0,05$. Os ensaios mecânicos mostraram que, para o grupo S os valores de força máxima (-14,03%, $p=0,0003$), rigidez (-21,68%, $p=0,0055$), DMO (-17,62%, $p=0,019$) e percentual de osso trabecular (-57,2%, $p=0,0001$), diminuíram significativamente em comparação com o grupo CI. A comparação das propriedades mecânicas simultâneas entre os grupos avaliados após 51 dias (STxCIIxSNT) mostrou diferença estatística significante entre os grupos para força máxima de ($p=0,0014$), rigidez ($p=0,0010$), DMO ($p=0,0095$) e percentual de osso trabecular ($p<0,0001$). O grupo ST apresentou aumento significativo na força máxima (+10,23%, $p<0,05$), rigidez (+21,91%, $p<0,001$), DMO (+9,46%, $p<0,05$) e percentual de osso trabecular (+48,82%, $p<0,001$) em comparação com o grupo SNT. Na

comparação dos grupos SNT e CII também houve diminuição significativa (-14,4%, $p<0,05$) para força máxima, rigidez (-25,21%, $p<0,005$), DMO (-13,34%, $p<0,05$) e percentual de osso trabecular (-52,06%, $p<0,001$). Finalmente, a comparação entre os grupos ST e CII não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) para os valores de força máxima, rigidez, DMO e percentual de osso trabecular. Em relação à análise histológica qualitativa o grupo S apresentou ossos com características histológicas condizentes com osteopenia, com trabéculas ósseas bem mais delgadas em quantidade muito menor tanto na epífise quanto na metáfise, quando comparado ao grupo CI. O grupo suspenso apresentou ainda, diminuição na espessura do tecido ósseo compacto e redução significativa na quantidade de tecido esponjoso em sua porção mais interna. A espessura do tecido ósseo compacto se mostrou similar nos diferentes grupos (ST, SNT e CII). Todavia, a espessura e a quantidade de trabéculas do osso esponjoso diferiram expressivamente nos diferentes grupos. O grupo ST apresentou uma aparente maior quantidade de trabéculas ósseas, bastante delgadas, ao passo que o grupo CII apresentou, comparativamente, uma menor quantidade de trabéculas bem mais espessas. Comparado a estes últimos, o grupo SNT apresentou uma menor quantidade de trabéculas com delgada espessura. Com a suspensão por três semanas os parâmetros mostraram que houve deterioração da qualidade óssea expressa pela diminuição da densidade mineral óssea, enfraquecimento mecânico do osso e perda de massa óssea trabecular. A quantidade de osso trabecular na região metafisária foi o parâmetro mais afetado pela hipoatividade, mas também o elemento que apresentou a resposta mais rápida para a atividade motora. A conclusão foi que a natação reverteu mais rapidamente a deterioração osteopênica causada pela hipoatividade, com recuperação completa da qualidade óssea.

Palavras-Chave: Tecido ósseo. Suspensão pela cauda. Osteopenia. Natação. Propriedades mecânicas. Histomorfometria. Densidade Óssea.

ABSTRACT

ABSTRACT

Silva AV. **Assessment of the tibia bone quality in rats subjected to hypoactivity by tail suspension and treated with swimming exercises** [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014.

The bone is able to detect mechanical stimuli and to transform them into cell response so that the bone tissue can maintain its health and to adapt to different mechanical demands (mechanotransduction). Thus, the bone structure become more resistant when the mechanical solicitations are increased and, conversely, less resistant when in hypoactivity conditions as occurring during immobilizations, in locomotor sequela, prolonged bed rest or in a microgravity environment as experienced by astronauts. In general, hypoactivity leads the bone to develop a decreased and deteriorated mass, thus characterizing conditions of osteopenia or osteoporosis. Thus, physical activity such as swimming is indicated as one of the factors that contribute to the bone health. However, the relation between swimming and bone quality in individuals with osteopenia has not been sufficiently studied to fully support clinical recommendations. So, the aim of this study was to investigate the effectiveness of swimming in recovering bone quality evaluated in osteopenic tibias of rats that spent three weeks in hindlimb suspension. Fifty Wistar rats were used and divided into five groups (n = 10/group); two control and three experimental groups. There was a group suspended by the tail for 21 consecutive days (S) and its control kept in regular cages for the same period (CI). In the suspended and trained group, animals were suspended for 21 consecutive days and then underwent a 20 swimming sessions (ST). In the suspended, not trained group, animals were suspended for 21 days and released in regular cages for 30 days (SNT). In the control group II rats were kept in regular cages for 51 days without intervention (CII). The bone quality was assessed by densitometry (BMD), bending mechanical testing and histomorphometry. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Mechanical tests showed that for the suspended group there was a decrease of the maximum force (-14.03%, $p = 0.0003$), stiffness (-21.68%, $p = 0.0055$), BMD (-17.62 %, $p = 0.019$) and the percentage of trabecular bone (-57.2%, $p = 0.0001$) in comparison with the control group. Comparison among the groups after 51 days (STxCIIxSNT) showed statistically significant differences between groups for maximum force ($p = 0.0014$), stiffness ($p = 0.0010$), BMD ($p = 0.0095$) and the percentage of trabecular bone ($p < 0.0001$). The suspended and trained group showed a significant increase in maximum force (+10.23%, $p < 0.05$), stiffness (+21.91%, $p < 0.001$), BMD (+9.46%, $p < 0.05$) and the percentage of trabecular bone (+48.82%, $p < 0.001$) compared to the suspended and not trained group. When the suspended but not trained group was compared to control CII, there was also a significant decrease (-14.4%, $p < 0.05$) for maximum force, stiffness (-25.21%, $p < 0.005$), BMD (-13.34%, $p < 0.05$) and the percentage of trabecular bone (-52.06%, $p < 0.001$). Finally, the comparison between

group suspended and trained ad its control and CII showed no statistically significant difference ($p>0.05$) for all the parameters. Considering the qualitative histological analysis, suspended group presented bones with histological characteristics consistent with osteopenia, with thinner trabecular bone and in much less quantity both in the epiphysis and in the metaphysis. The suspended and trained group had a higher quantity of trabecular bone, with thinner trabeculae, while the CII group showed a comparatively smaller amount of much thicker trabeculae. Compared to the latter, the suspended and not trained group had an apparent smaller amount of trabeculae with a thinner thickness. In conclusion, the three week suspension caused a marked deterioration of the tibia bone tissue that was completely reverted by swimming and partially reverted with spontaneous cage activities taking in consideration all the parameters analyzed.

Keywords: Bone tissue. Tail suspension. Osteopenia. Swimming. Mechanical properties. Histomorphometry. Bone Density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Preparação para instalação da parte do sistema de suspensão na cauda, com o animal contido manualmente. A cauda foi lavada e recebeu tintura de benjoim.....	43
Figura 2.	Colocação da tira de espuma adesiva para proteção da cauda do animal. A- Colocação da espuma adesiva e seu posicionamento, de modo que a extremidade dela e as laterais ficassem livres (B).....	44
Figura 3.	Animal em contenção e detalhes do enfaixamento da cauda com esparadrapo.....	44
Figura 4.	Vista de frente da gaiola de suspensão dos animais, composta por uma base formada por uma caixa em acrílico, com outra caixa, em grades de aço inoxidável, encaixada de maneira invertida pela abertura, de modo a formar um compartimento único.....	45
Figura 5.	(A) Eixo de suspensão montado com todos os acessórios. (B) Detalhe da presilha de deslizamento no eixo (C) Detalhe do sistema de bloqueio para delimitação da excursão da presilha (46).....	46
Figura 6.	Figura 6. Fixação da cauda do animal ao eixo de suspensão por meio da presilha deslizante. A- Sistema de bloqueio para delimitação da excursão da presilha. B- Presilha. C- Extremidade da cauda que ficou livre do enfaixamento. D- Cauda do animal envolvida com espuma adesiva fixada com esparadrapo.....	47
Figura 7.	Rato suspenso pela cauda com apoio dos membros anteriores e os membros posteriores sem contato com a base ou com as laterais da gaiola.....	48
Figura 8.	Animais em treinamento de natação.....	49

Figura 9.	À esquerda, equipamento densitômetro modelo DPX ALPHA LUNAR. À direita, alinhamento das tíbias no fundo do recipiente com soro fisiológico para escaneamento e obtenção da DMO.....	51
Figura 10.	Imagens obtidas com o escaneamento das tíbias, para medida da densidade mineral óssea.....	51
Figura 11.	Posicionamento da tíbia no suporte para realização do ensaio de flexão em três pontos. A tíbia ficava apoiada em dois suportes metálicos com 25,0 mm de afastamento entre si e a força vertical foi aplicada no centro da diáfise, na face posterior do osso.....	53
Figura 12.	Comparação da força máxima entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspenso pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspenso pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspenso pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.....	59
Figura 13.	Comparação da rigidez entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspenso pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspenso pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspenso pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.....	60
Figura 14.	Comparação da densidade mineral óssea entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspenso pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspenso pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspenso pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.....	62

Figura 15. Aspectos histológicos representativos nas regiões da epífise, metáfise e parte da diáfise dos grupos: Controle I (CI) sem suspensão e do grupo Suspenso (S). A-B: vista panorâmica da peça. C-D: fotomicrografias do centro da epífise e aspecto do osso trabecular. Observar que o grupo suspenso apresentou trabéculas ósseas bem mais delgadas e em menor número, quando comparado com o grupo CI. Coloração: Tricrômico de Masson. A-B, barras de escala: 1500 µm; aumento original 2x; C-D, barras de escala: 140 µm; aumento original 160x.....

63

Figura 16. Aspectos histológicos das regiões do fragmento proximal da tibia no grupo CII (controle II), do grupo ST (suspenso treinado) e grupo SNT (suspenso não treinado), todos avaliados 51 dias após o início do experimento. A-C: fotomicrografias de vista panorâmica da epífise, metáfise e parte da diáfise. D-F: fotomicrografias da região central da metáfise mostrou o aspecto do osso trabecular. O grupo CII (D) apresentou trabéculas ósseas espessas e em grande número; o grupo ST apresentou trabéculas ósseas delgadas e em grande número, e o grupo SNT trabéculas ósseas delgadas e em menor número. Coloração: Tricrômico de Masson (TM). A-C, barras de escala: 1500 µm; aumento original 2x; D-F, barras de escala: 140 µm; aumento original 160x.....

65

Figura 17. Comparação do percentual de osso esponjoso entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspenso pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspenso pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspenso pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.....

67

LISTA DE QUADRO E TABELAS

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1.	Apresentação dos grupos experimentais e intervenções.....	42
Tabela 1.	Peso corporal médio dos animais (g) e desvio padrão no início e final de cada fase experimental.....	57
Tabela 2.	Valores médios de força máxima e rigidez da tíbia esquerda das ratas nos diferentes grupos.....	58
Tabela 3.	Valores médios da densidade mineral óssea obtidos pela análise realizada na tíbia esquerda de todos os grupos.....	61
Tabela 4.	Percentual de osso esponjoso.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FGF 23	Fator de crescimento de fibroblastos 23
OCN	Osteocalcina
NASA	National Aeronautics and Space Administration
DMO	Densidade Mineral Óssea
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
USP	Universidade de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
DXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i> - Absorimetria de Raios X de Dupla Energia
FM	Força Máxima
R	Rigidez
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
d.p.	Desvio Padrão
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor Kappa B</i> – Receptor ativador do fator nuclear Kappa B
IGFs	<i>Insulin-like growth factor</i> – Fatores de crescimento semelhantes à insulina
TGF-beta	Fator de Crescimento Tumoral-beta
OPG	Osteoprotegerina

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
G	Gramma
cm	Centímetro
g/cm ²	Gramma por centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
N	Newton
Kgf	quilograma força
Mm	milímetro
μm	Micrômetro
N/mm	Newton por milímetro

SUMÁRIO

SUMÁRIO¹

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Tecido ósseo.....	29
1.2 Remodelação e reabsorção óssea.....	20
1.3 Metabolismo ósseo e perda de massa óssea.....	31
1.4 Modelos experimentais de suspensão animal utilizados para simulação de hipoatividade.....	34
1.5 Treinamento/natação.....	37
 2. OBJETIVO.....	 40
 3. MATERIAL E MÉTODO.....	 42
3.1 Animais.....	43
3.2 Grupos experimentais.....	43
3.3 Técnica de suspensão.....	44
3.3.1 <i>Preparo do animal para a suspensão</i>	44
3.3.2 Gaiola e sistema de suspensão.....	47
3.4 Técnica de exercitação - Treinamento.....	50
3.5 Avaliação óssea – Tíbias direita e esquerda.....	52
3.6 Densitometria Óssea.....	52
3.7 Ensaio Mecânico.....	54
3.7.1 <i>Ensaio de flexão em três pontos</i>	54
3.8 Processamento Histológico.....	55
3.9 Análise estatística.....	56
 4. RESULTADOS.....	 57
4.1 Peso corporal.....	58
4.2 Propriedades Mecânicas.....	59
4.2.1 <i>Força Máxima</i>	60

¹ De acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso: Parte IV.

4.2.2 Rigidez.....	61
4.3 Densitometria Óssea (DXA)	62
4.4 Histomorfometria.....	64
4.4.1 Análise qualitativa.....	64
4.4.2 Análise quantitativa (%)......	68
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÃO.....	79
7. REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS.....	91

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O osso é tecido conjuntivo especializado que, funcionalmente interage com outros órgãos e tecidos, como por exemplo, tecido adiposo, pâncreas, cérebro (1). Junto ao tecido cartilaginoso, forma o esqueleto que apresenta várias funções, principalmente aquelas de natureza mecânica como: a) sustentação e apoio da musculatura; b) manutenção da postura e transmissão de forças; c) movimentação com estabilidade; d) proteção de órgãos vitais e albergamento da medula óssea. Além disso, o esqueleto atua como reservatório de íons importantes para a homeostase metabólica (2-4). Recentemente, estudos comprovam a capacidade óssea de funcionar como um órgão endócrino capaz de produzir hormônios (FGF23-fator de crescimento de fibroblasto 23 e osteocalcina-OCN) e interferir no metabolismo geral (5).

O tecido ósseo pode ser diferenciado sob o aspecto morfológico com diferenças em relação à disposição dos seus elementos constituintes básicos (lamelas). Quando estas lamelas se justapõem firmemente, com orientação comum, resulta a formação de um tecido ósseo denso, denominado lamelar ou compacto. Em contrapartida, quando as lamelas assumem diferentes orientações, formam-se grandes espaços entre as traves ósseas e o resultado é um tecido ósseo menos denso, mais poroso, denominado osso trabecular ou esponjoso (6).

Microscopicamente, o osso compacto é formado por cilindros que são camadas concêntricas em torno de um canal, chamado de Havers que contém vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Nessas camadas estão localizados os osteócitos que se comunicam por meio de canaliculos que carregam substâncias nutritivas provenientes de arteríolas e conduzem restos do metabolismo celular para as vênulas. É importante ressaltar que os osteócitos dependem do canal de Havers para sua sobrevivência e todo esse conjunto (canal central, lamelas concêntricas e osteócitos) é considerado como a unidade fundamental do osso lamelar. Os canais de Havers chegam até um sistema canalicular maior conhecido como de Volkmann

(3). Esse sistema está presente no osso compacto, que predomina na diáfise, e contribui para a resistência do osso como um todo. Entretanto, em direção às extremidades, o osso cortical vai desaparecendo, sendo substituído pelo osso esponjoso. Este tipo de osso também predomina em alguns ossos como os da bacia pélvica, corpos vertebrais e nos ossos dos pés e mãos (4).

Os ossos armazenam 99% do cálcio do corpo humano. A matriz óssea é composta por 25% de água, 25% de proteínas fibrilares e 50% de sais minerais cristalizados. Os componentes inorgânicos dos ossos são responsáveis pela rigidez enquanto os orgânicos respondem pela elasticidade. O principal componente inorgânico é o fosfato que interage com o hidróxido de cálcio transformando-se em hidroxiapatita. Conforme ocorre a formação dos cristais de hidroxiapatita, outros materiais inorgânicos como o carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto vão se incorporando a ela. O componente orgânico inclui fibras principalmente de colágeno tipo I, além de células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e substância base (proteoglicanos e glicoproteínas). A parcela orgânica da matriz óssea é sintetizada principalmente pelos osteoblastos (4).

1.2 Remodelação e reabsorção óssea

A remodelação óssea é fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. A reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos repetitivos ao longo da vida comandados pelas células do tecido ósseo, que incluem os osteoblastos (células de intensa atividade metabólica e formadoras de osso), osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) e osteócitos (células maduras mantenedoras do trofismo ósseo e que correspondem de 90 a 95% de todas as células ósseas) (7;8).

Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação ocorrem constantemente, sendo que, o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (7;9).

O metabolismo ósseo sofre influências mecânicas representadas pelas solicitações gravitacionais e as funcionais, que resultam em esforços de

compressão, tração, flexão, torção, cisalhamento, geralmente combinados. Sendo assim, o tecido ósseo se adapta aos estímulos mecânicos, modificando e adaptando a composição e arquitetura do esqueleto (10). Para cumprir estas funções o tecido ósseo possui um sistema mecanossensorial (10;11). A clássica lei de Wolff resumidamente afirma que “a forma e a estrutura de um osso são reflexos das solicitações mecânicas a que está submetido” (11), estabelece uma relação entre a morfologia óssea e os estresses, ou seja, identifica a capacidade do osso em se adaptar às solicitações mecânicas, em termos de macro e microestrutura. Em última análise, os osteoclastos e os osteoblastos tornam-se os agentes efetores da lei de Wolff, por ação de um estímulo mecânico direto ou indireto.

A mecanotransdução pode ser interpretada como uma reação biológica a partir de um estímulo mecânico que regulará a formação de um tecido ou órgão (12). No esqueleto, este fenômeno ocorre constantemente nas células ósseas e pode inibir a reabsorção óssea, aumentar a proliferação celular, entre outros efeitos (13;14).

1.3 Metabolismo ósseo e perda de massa óssea

No ser humano há predomínio da osteogênese até o final da segunda década de vida, em que se estabelece o pico de massa óssea, mas que sofre influência de fatores genéticos, doenças, dieta e estilo de vida. Em termos de idade o decréscimo natural da massa óssea tem início em torno dos quarenta anos, quando surge um balanço negativo entre formação e reabsorção óssea (15).

Com o desuso, o esqueleto reconhece que certa quantidade de tecido ósseo não é mais necessária para manter a integridade estrutural e há diminuição da massa óssea, com deterioração da microarquitetura estrutural (15;16). Por outro lado, o aumento da solicitação mecânica pode desencadear aumento da massa óssea e resultar ossos mais fortes (17). Esta correlação pode ser facilmente verificada sob condições clínicas e experimentais associadas com a função motora diminuída, quando as forças funcionais são grandemente reduzidas, tais como nas sequelas neurológicas (18), repouso prolongado (19;20), paralisia experimental

temporária causada por injeção de toxina botulínica (21) ou mesmo imobilização gessada (22). Além disso, o osso pode ser profundamente afetado por alterações hormonais, mas este aspecto não será abordado neste texto. Pode-se afirmar, portanto, que o osso é capaz de ajustar sua resistência ao grau de solicitação mecânica a que está sujeito. Quantidades de fibras colágenas e sais orgânicos podem ser modificadas se o osso não está sujeito às solicitações mecânicas (4;17;23). Sendo assim, ocorre aumento da excreção urinária de cálcio durante um confinamento prolongado no leito, não somente devido à inatividade, mas também à ausência de compressão longitudinal sobre os ossos (11;23).

A própria força da gravidade é fundamental para manutenção da saúde do esqueleto, sendo que um dos principais problemas enfrentados por astronautas que permanecem longos períodos no espaço é a intensa perda de massa óssea que apresentam, em decorrência da ausência da força da gravidade (6). Essa perda pode não ser recuperada completamente mesmo após seis meses de retorno à Terra (24).

É definido como osteopênico o esqueleto com menos tecido ósseo comparado com o normal e, nesta condição, atividades habituais não causam fraturas espontâneas ou dores ósseas, só ocorrendo após queda ou impactos maiores. Esta condição pode estar associada a várias condições corriqueiras como senilidade, diminuição da atividade física e carência de estrógeno nas mulheres, que perdem em média 8% da massa óssea por década após a menopausa, enquanto que os homens perdem 3% após a andropausa.

A osteoporose fica caracterizada quando a perda óssea atingiu tal grau que leva ao enfraquecimento substancial dos ossos, causando dores e fraturas espontâneas ou após pequenos traumas (15;23;25;26). Em termos objetivos, a Organização Mundial da Saúde reconhece a densitometria óssea como o exame padrão para avaliar a densidade mineral óssea. Os valores são obtidos do terço proximal do fêmur e nas vértebras lombares e coletados de uma população adulta jovem hígida. Desta população de referência foi estabelecido o *T-score*, em desvios-padrão (27). Para valores de densidade mineral óssea que ficam entre 1 e 2,5 desvios-padrão abaixo da média o diagnóstico é de osteopenia. Se houver fraturas relacionadas com a fragilidade óssea, o diagnóstico é de osteoporose estabelecida

(23;25). Medidas precoces na determinação da densidade mineral óssea são importantes para prevenção de fraturas e manutenção da qualidade de vida (28).

Para animais experimentais não há valores populacionais padronizados que caracterizam um estado osteopênico ou osteoporótico e os estudos sempre devem ser comparados com um grupo controle normal e sem intervenção. Além disso, como o diagnóstico de osteoporose implica na ocorrência de fraturas, fica difícil estabelecer este diagnóstico em animais de laboratório. Por isso é mais prudente usar o termo osteopenia, quando ocorre o enfraquecimento ósseo.

Conhecer a definição de osteoporose é importante, porém a etiologia sempre deverá receber grande destaque, pois ela é essencial ao tratamento (25).

Segundo Frost (25) o termo “osteoporose” refere-se a alterações da microarquitetura óssea e pode ser interpretada como um estado final de osteopenia. Há diferentes classificações para osteoporose, com variação de certos conceitos entre elas:

- Osteoporose verdadeira: é chamada osteoporose sintomática e irreversível, onde qualquer tipo de exercício pode causar dor e/ou fraturas espontâneas. É decorrente de uma desordem no mecanoacoplamento (conversão de forças mecânicas aplicadas no osso em sinal mecânico percebido pelos osteócitos) (29).

- Osteoporose fisiológica: também chamada senil. O indivíduo não sente dor e não há fraturas em decorrência de atividades cotidianas. É causada por diminuição da força muscular e da atividade física. Afeta três grupos de pessoas: as saudáveis sedentárias, mulheres após a menopausa e pessoas com doenças crônicas debilitantes (sequelas neurológicas, alcoolismo, doenças cardíacas, etc).

- Situação combinada: é a associação de variáveis das situações citadas na osteoporose verdadeira e na fisiológica.

- Osteopenia transitória: também chamada de osteoporose por desuso. É reversível e pode afetar mais de um segmento, geralmente após períodos de imobilização (30). Pode, também, ter causa idiopática.

A doença pode também ser classificada como primária tipo 1, que é aquela que ocorre na mulher após a menopausa. A primária tipo 2, também conhecida como senil ocorre tanto no homem, quanto na mulher, após os 75 anos de idade. Finalmente, há a osteoporose secundária quando resulta do uso prolongado de medicamentos (corticoides), ou de condições como distúrbios hormonais

(hiperparatireoidismo) e outras alterações metabólicas decorrentes de várias etiologias.

Em termos celulares, a osteoporose ocorre quando a atividade dos osteoclastos supera aquela dos osteoblastos. Os osteoclastos criam cavidades excessivamente profundas que não são preenchidas suficientemente, ou quando os osteoblastos não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção normal. Portanto, a reabsorção excede a formação (15;31).

1.4 Modelos experimentais de suspensão animal utilizados para simulação de hipoatividade

Os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, bem como na osteoporose são os mesmos em ratos e humanos. Portanto, a utilização de modelos animais experimentais é importante para estudar a eficácia de métodos prevenção e tratamento (32-34).

Os estudos em que os animais são mantidos em suspensão ou hipocinesia foram inicialmente desenvolvidos para simular as condições que acontecem em voos espaciais. Embora o método utilize diferentes condições de hipoatividade (os animais podem realizar contrações dinâmicas, porém com carga mínima), as alterações podem ser observadas nos músculos e nos ossos de acordo com o tempo de exposição a essas situações (35;36).

Com a finalidade de investigar a osteopenia que ocorre em astronautas em longos períodos no espaço, vários modelos de laboratório foram empregados para simular o que ocorre em um ambiente de microgravidade, vez que as pesquisas realizadas em voos espaciais reais são caras e de difícil realização. A ideia de utilizar a suspensão pelos membros posteriores de ratos como modelo de simulação de microgravidade surgiu na década de 70 pela *National Aeronautics and Space Administration (NASA) – Ames Research Center* (33). Os mecanismos responsáveis pela perda óssea no envelhecimento e voo espacial são, provavelmente, diferentes,

mas as similaridades nas duas circunstâncias podem ser benéficas nos estudos de ambos os casos (32;37).

Alguns modelos foram desenvolvidos, porém exigiam procedimentos cirúrgicos para imobilização do animal e não reproduziram as alterações observadas em voos espaciais. Além disso, dificultava a recuperação pós imobilização (37). Em meados de 1975 o projeto de um modelo de simulação de microgravidade começou a ser testado com o objetivo de simular condições de voo espacial. Era simples, no entanto forneceu informações valiosas para desenvolvimento do primeiro modelo de suspensão desenvolvido por uma pesquisadora da NASA, Morey em 1979 (38). O modelo de suspensão foi desenvolvido com o objetivo de simular condições de voo espacial. Inicialmente, o animal foi preso a uma malha ortopédica de maneira que as patas dianteiras permanecessem em contato com o solo e os membros posteriores ficassem livres para movimentação, porém sem contato com o solo. Em seguida, o animal foi preso a um fio metálico e conectado a um sistema de suspensão que permitisse movimentação pela gaiola em busca de alimento e água. Com este modelo, foi possível manter maior mobilidade e a possibilidade de mantê-lo no sistema até 20 dias consecutivos. Por meio de análises histológicas, a autora verificou a diminuição da neoformação óssea, atrofia muscular, alterações cardíacas e renais, semelhantes às aquelas observadas em astronautas. Essa autora encontrou dificuldades na execução do modelo de suspensão, como interferências na circulação venosa e ulcerações provocadas pelo sistema de suspensão.

Mussachia et al (34), descreveram um método de suspensão, a partir do modelo criado por Morey (38). O modelo desenvolvido foi de elevação do animal pelo corpo. Nesse sistema o animal foi suspenso por um envoltório confeccionado em brim, sendo que a cabeça e a cauda eram colocadas em aberturas feitas no tecido. Pôde ser constatada atrofia muscular significativa nos animais suspensos.

O modelo de suspensão de membros posteriores foi utilizado em vários laboratórios. A técnica desenvolvida inicialmente foi mantida (38), com pequenas modificações no posicionamento e ângulo de movimentação dos animais. Essas modificações viabilizaram diferentes análises como, por exemplo, fluxo sanguíneo e alterações musculares. Um objetivo comum em todas as pesquisas foi a manutenção da saúde do animal, com objetivo de viabilizar sua recuperação pós suspensão (39;40).

O modelo de suspensão pela cauda do animal originou-se com os russos, que utilizaram gesso para a tração da cauda. No início de 1980, os cirurgiões ortopédicos da Universidade do Sul da Califórnia sugeriram que a suspensão poderia ser realizada através de enfaixamento da cauda, utilizando fita de tração ortopédica. Essa nova técnica resultou em menor estresse nos animais. Portanto, foi considerado como método adequado, com boa tolerância dos ratos e boa recuperação após períodos de suspensão (41;42).

Em 1987, Wronski e Morey-Holton (42) compararam a suspensão pelo quadril e a suspensão pela cauda, em ratos. Observaram que o modelo de suspensão pela cauda foi o que mais se aproximou dos efeitos provocados pela microgravidade.

Em estudo posterior, Morey-Holton et al. (41) compararam animais que permaneceram em microgravidade simulada (suspensão pela cauda) e animais que estiveram em voos espaciais. Foi observado que nas duas situações os animais apresentavam alterações fisiológicas semelhantes. Portanto, o modelo de suspensão de rato pela cauda foi validado sendo, atualmente, considerado representativo para avaliar os mecanismos fisiológicos da hipoatividade no sistema musculoesquelético, e também de outros sistemas, que ocorrem em situações de microgravidade (24;43;44).

A partir desses estudos foram descritos outros modelos e métodos de suspensão pela cauda, com adaptações na tentativa de preservar os animais de lesões físicas e emocionais (35;45-48). Jaspers et al. (47) fixaram um clipe metálico na pele da cauda dos animais que, com auxílio de uma fita ortopédica, foi presa a um sistema de fixação. Winiarskis et al. (49) e Kasper et al. (33) desenvolveram modelos em que roldanas foram utilizadas como sistema de fixação dos animais. A movimentação permitida era em ângulo de 360°.

A importância do ângulo de inclinação do tronco do animal foi abordada por Hargens et al. (50). Eles concluíram que este ângulo determina a quantidade de peso aplicado nos membros anteriores, bem como a tensão na cauda do animal. O animal aplica carga de cerca de 50% de seu peso corporal nos membros anteriores quando o ângulo entre o tronco e o piso da gaiola for em torno de 30°, o que é suficiente para a locomoção e não traz muito incômodos no posicionamento.

O procedimento operacional padrão para modelos de suspensão pela cauda com aplicações em ratos adultos jovens foi atualizado e aprovado pela (NASA), em 2001. De acordo com Morey-Holton et al. (37), nesse procedimento os animais são contidos sem necessidade de anestesia e a limitação dos movimentos deve ser realizada sem prejudicar a saúde geral do animal.

Diferentes métodos de suspensão foram usados no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, a partir dos modelos experimentais descritos por Kasper et al. (33). Nos primeiros modelos utilizados (51;52) os animais foram anestesiados, presos a um sistema de suspensão e a extremidade distal da cauda amputada, com objetivo de evitar necrose local. Depois, foi tentado usar o modelo de Ferreira et.al. (53). Em que a tração era aplicada na pele da cauda do animal. Apesar destes autores relatarem bons resultados, eles não foram reproduzidos no referido laboratório. Neste sentido Falcai e Volpon (54) substituíram a tração cutânea pela esquelética, por meio de um fio de aço atravessando a vértebra caudal. Estes autores concluíram que esse método foi eficaz para manter os animais suspensos por um período de seis semanas, porém não apresentava vantagens em relação ao modelo clássico de tração cutânea para períodos mais curtos de tempo.

Atualmente, os métodos de suspensão considerados adequados são os que preservam a saúde do animal, com ausência de lesões ou amputações, bem como o desenvolvimento de sistemas que permitam monitoramento constante (37;55-58). Uma vantagem do sistema é sua reversibilidade, isto é, podem-se estudar os efeitos pós-hipoatividade física e estabelecer controles adequados (58).

1.5 Treinamento/natação

Em seres humanos, a osteopenia pode ser tratada com drogas que atuem favoravelmente no metabolismo do tecido ósseo (59) combinadas com estilo de vida saudável, que inclui dieta equilibrada, evitando hábitos e substâncias nocivas (por exemplo, tabagismo) e atividade física regular (60).

O exercício pode estimular o trofismo ósseo (4;61;62), com aumento da densidade mineral óssea, da massa óssea, do volume ósseo e da espessura trabecular, com a vantagem de não interferir com a distribuição espacial do trabeculado ósseo (63;64), desempenhando assim, um papel importante na resposta osteogênica (64-67). Além disso, a prática de atividade física regular gera aumento da força muscular, agilidade, resistência, equilíbrio e flexibilidade (61;68).

O treinamento aquático é frequentemente utilizado em atletas e pacientes em reabilitação de lesões. É indicado para pacientes com limitação ou restrição de sustentação de peso. Esse treinamento tem amplo potencial de reabilitação, que vai desde o tratamento de lesões agudas até a manutenção da saúde, mesmo na presença de doenças crônicas. Com objetivo de aplicação eficaz, os pacientes devem progredir para uma combinação de exercício de sustentação parcial e sustentação completa de peso para prover o esforço mecânico necessário para estimular a formação óssea e minimizar a doença e o risco de fraturas (69).

Exercícios que exigem maior esforço físico, como correr e saltar pode resultar em quedas e nem sempre são recomendados para populações específicas, tais como idosos ou pessoas com deficiências ou doença sistêmica. Para essas populações, a atividade física aquática pode ser vista como exercício ideal (17), uma vez que o aumento da densidade óssea pode estar relacionado com a intensidade da atividade muscular, além da melhora no condicionamento cardio respiratório, flexibilidade, coordenação e equilíbrio (70).

Considerando a relação entre força muscular e densidade mineral óssea (DMO), possivelmente a intensidade da contração muscular tenha impacto em locais ósseos relacionados anatomicamente com os músculos que realizam essa contração (71;72). As contrações musculares aumentam o estresse mecânico no osso que, por consequência, aumenta em massa e resistência para fornecer uma estrutura de suporte ao estresse gerado (73).

Em ratas Wistar, Snyder et al. (74) compararam o exercício de natação (carga de 2% de peso, 2 horas/ dia, 5 dias/semana, durante 10 semanas) com a corrida. Os autores observaram que o grupo que treinou natação apresentou maior conteúdo mineral ósseo quando comparado ao grupo corrida. Em outro estudo realizado por Huang et al. (75) com a mesma comparação, porém com períodos de treinamento diferentes (carga de 2% e 4% de peso, 2 horas/ dia, 5 dias/semana,

durante 8 semanas), os autores constataram que os dois métodos resultaram em melhora nas propriedades mecânicas da tíbia e do fêmur. Entretanto, o aumento da densidade mineral óssea foi maior no grupo “corrida”.

O aumento da densidade mineral óssea e das propriedades mecânicas nos ossos foram constatados por Hoshi et al. (76) após avaliarem camundongos colocados em sessões de natação de 45 minutos/dia, cinco dias por semana, durante seis semanas consecutivas. Esse mesmo resultado foi relatado por Hart et al. (17) após submeterem ratas ovariectomizadas ao um programa de natação de 5 dias por semana, durante 60 minutos/dia por 12 semanas.

Embora reconhecido como sendo benéfico para a saúde em geral, o efeito da natação no tratamento da osteopenia é ainda controvertido em seres humanos (75). Bravo et al. (77) avaliaram os efeitos de um programa de exercício físico na água em mulheres osteopênicas, e concluíram que, apesar da intervenção ter melhorado a aptidão funcional, não houve efeito detectável sobre o sistema esquelético. No entanto, estudos com animais sugeriram um possível efeito positivo da atividade aquática na qualidade óssea, tanto durante o crescimento (61;72), quanto em ovariectomizadas (78) e também durante o envelhecimento (76).

Nesta mesma linha de investigação, em animais, ficou demonstrado que o exercício físico foi eficaz para amenizar ou prevenir as alterações ósseas e musculares induzidas pela ausência de contato com o solo, ou diminuição de estímulos mecânicos sobre ossos e músculos (79;80).

A duração do programa de exercício é uma variável que deve ser sempre considerada para o entendimento do processo de adaptação do tecido ósseo. Diversos autores realizaram estudos de exercitação em animais, que variaram de 3 a 20 semanas (64;74;76;81), evidenciando, que com protocolo adequado, a natação pode diminuir a perda óssea.

A relação entre natação e qualidade óssea em pacientes com osteopenia, não foi suficientemente estudada de forma a embasar cientificamente recomendações clínicas. As publicações sobre esse tema são escassas e conflitantes devido a diferentes características do treinamento tais como, intensidade, duração e frequência. Sendo assim, a realização de pesquisas, que determinem os prováveis benefícios obtidos com exercícios de natação sobre o tecido ósseo, poderiam reforçar a prescrição dessa atividade.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a eficácia de um programa de natação na recuperação da qualidade óssea em tíbias de ratas em que foi induzida a osteopenia com o modelo de suspensão pela cauda. Os métodos de avaliação da qualidade óssea foram a determinação da densidade mineral óssea, resistência mecânica e histomorfometria.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, protocolo nº141/2010 (anexo 1).

3.1 Animais

Foram utilizadas 50 ratas adultas jovens (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*) com peso médio inicial de $252\text{g} \pm 4\text{ g}$. O experimento foi conduzido de acordo com as recomendações da Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (82). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus Universitário da USP em Ribeirão Preto e mantidos em gaiolas padrão, em sala própria do biotério do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Ribeirão Preto-USP, com controle de temperatura, umidade do ar e ciclo claro/escuro.

O modelo de hipoatividade usado foi o de suspensão pela cauda e estes animais foram mantidos em gaiolas especiais, a serem descritas adiante. Durante o experimento não houve restrição intencional de ração e água.

3.2 Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos experimentais:

- Grupo controle I (CI): formado por 10 animais não suspensos, mas que permaneceram por 21 dias em gaiolas coletivas, sem intervenção.
- Grupo suspenso (S): formado por 10 animais que permaneceram em suspensão pela cauda durante 21 dias consecutivos, sem outra intervenção.
- Grupo controle II (CII): formado por 10 animais sem suspensão e sem natação, observados durante 51 dias.

- Grupo suspenso não treinado (SNT): formado por 10 animais suspensos por 21 dias consecutivos e soltos em gaiolas comuns por mais 30 dias.
- Grupo suspenso e treinado (ST): formado por 10 animais que permaneceram em suspensão durante 21 dias consecutivos. Após este período foram submetidos a 20 sessões de natação.

O quadro 1 resume a distribuição dos animais nos diferentes grupos.

Quadro 1. Apresentação dos grupos experimentais e intervenções

Grupos	Período de estudo e intervenção	
	21 dias	30 dias
Controle I – (CI)	sem suspensão	-
Suspenso – (S)	suspensão	-
Controle II – (CII)	sem suspensão	sem treinamento
Suspenso não treinado – (SNT)	suspensão	sem treinamento
Suspenso e treinado – (ST)	suspensão	natação

3.3 Técnica de suspensão

O modelo de suspensão pela cauda do rato foi realizado a partir da descrição de Kasper et al. (33) e Morey-Holton et al. (83), com adaptações como realizadas por Silva e Volpon (52).

3.3.1 Preparo do animal para a suspensão

Para a instalação do sistema de suspensão os ratos foram pesados e contidos manualmente com ajuda de um tecido, sem uso de anestésicos (Figura 01). A cauda do animal foi lavada com água e detergente e, após seca, recebeu tintura

de benjoim (20% de tintura: *Styrax* spp; Rioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), para proteção cutânea e melhorar a aderência.

Figura 1. Preparação para instalação da parte do sistema de suspensão na cauda, com o animal contido manualmente. A cauda foi lavada e recebeu tintura de benjoim.

Em seguida, a cauda foi parcialmente envolvida por uma tira de espuma de poliuretano autoadesiva (Reston[®], 1560m, 3M, Sumaré, SP, Brasil), desde próximo de sua origem até os dois terços proximais onde a espuma era dobrada e voltava até a base da cauda, fazendo uma alça. As partes laterais da cauda foram mantidas sem cobertura de espuma para evitar interferências circulatórias e a extremidade ficou livre para servir de indicadora dessas condições (Figura 2).

Figura 2. Colocação da tira de espuma adesiva para proteção da cauda do animal. (A) Colocação da espuma adesiva e seu posicionamento na cauda, de modo que a extremidade dela e as laterais ficassem livres (B).

Foram utilizados enfaixamentos adicionais de esparadrapo para melhorar a fixação da tira de espuma adesiva na cauda do animal. A alça feita com a dobra da espuma serviu para prender uma presilha, para conectar o animal ao sistema de suspensão da gaiola (Figura 3).

Figura 3. Animal em contenção e detalhe do enfaixamento da cauda com esparadrapo

3.3.2 Gaiola e sistema de suspensão

A gaiola utilizada para suspender os animais era formada por duas partes independentes. A base era constituída por uma caixa de acrílico com 35,0 cm de largura, 35,0 cm de comprimento e 21,5 cm de altura, aberta superiormente. Havia uma abertura em uma das paredes laterais para introdução do bico do reservatório de água.

Sobre essa caixa de acrílico foi colocada, em posição invertida, outra caixa construída em grade metálica com 35,5 cm de largura, 35,5 cm de comprimento e 24,0 cm de altura. Este compartimento superior foi utilizado, ainda, como suporte para o sistema de fixação do animal. Após o acoplamento, as duas caixas formaram um compartimento único (Figura 4).

Figura 4. Vista de frente da gaiola de suspensão os animais, composta por uma base formada por uma caixa em acrílico, com outra caixa, em grades de aço inoxidável, encaixada de maneira invertida pela abertura, de modo a formar um compartimento único.

A parte do sistema de tração da gaiola era formada por uma haste de aço retilínea, cilíndrica e roscada, com 40,0 cm de comprimento e 4,5 cm de diâmetro que era fixada nas grades ao longo do maior diâmetro da gaiola, por meio de porcas metálicas tipo borboleta, de modo que sua altura pudesse ser controlada. Nesta haste foi dependurada uma presilha que tinha, na outra extremidade, um encaixe para prender a alça de espuma. A presilha podia ser usada pelo animal para deslizamentos e permitia rotação de 360° (Figura 5).

Em cada extremidade da haste roscada havia uma pequena chapa de alumínio fixada por porcas para delimitar a extensão de 25,0 cm do eixo metálico a ser utilizado pelo animal para mover-se e, com isso, impedir contato com as paredes da gaiola.

Figura 5. (A) Eixo de suspensão montado com todos os acessórios. (B) Detalhe da presilha de deslizamento no eixo (C) Detalhe do sistema de bloqueio para delimitação da excursão da presilha (52).

Para colocar cada animal em suspensão uma extremidade da presilha foi fixada na alça que saía da cauda da rata e, a outra, à barra de deslizamento (Figura 6), cuja altura era ajustada individualmente, de modo a manter inclinação do tronco do animal em $\sim 30^\circ$, e permitir apoio adequado dos membros anteriores e locomoção para acesso à ração e água.

Figura 6. Fixação da cauda do animal ao eixo de suspensão por meio da presilha deslizante. A- Sistema de bloqueio para delimitação da excursão da presilha. B- Presilha. C- Extremidade da cauda que ficou livre do enfaixamento. D- Cauda do animal envolvida com espuma adesiva fixada com esparadrapo.

O assoalho da gaiola foi forrado com maravalhas trocadas diariamente. Foi realizada avaliação diária das condições do animal, particularmente da cauda, atentando-se para a alteração da cor, edema e ainda, se o sistema de suspensão estava ou não adequado, sem soltura ou demasiadamente apertado. Especial atenção foi dada para o ajuste da inclinação do tronco em $\sim 30^\circ$ (Figura 7).

Figura 7. Rato suspenso pela cauda com apoio dos membros anteriores e os membros posteriores sem contato com a base ou com as laterais da gaiola.

Os animais do grupo suspenso não treinado (SNT) ficaram suspensos por 21 dias e, em seguida, transferidos para gaiolas padrão por 30 dias, com cinco animais por gaiola, onde foram liberados para atividade espontânea.

Todos os animais foram pesados após o término da suspensão, bem como na fase final da liberação.

3.4 Técnica de exercitação - Treinamento

Os animais do grupo suspenso treinado (ST) foram submetidos ao exercício de natação, realizado em grupo. Após completar o período de suspensão as ratas foram transferidas para gaiolas comuns e daí retiradas para a natação.

Para este treinamento foi utilizado um reservatório retangular de 500 litros de capacidade, fabricado em vidro, com base de 100 x 60 cm e profundidade de 60 cm, que foi preenchido com água até a altura de 40 cm. A temperatura da água foi mantida em torno de 32°C por meio de aquecedor.

Durante a natação os animais do grupo treinado foram mantidos em observação permanente para evitar afogamento e impedir que, eventualmente, houvesse apoio indevido em outro animal ou na borda do tanque ou ainda que flutuassem, deixando de se movimentar (Figura 8).

Figura 8. Animais em treinamento de natação.

O treinamento de natação seguiu o protocolo utilizado por Ueno et al. (84) e Huang et al. (75), porém sem a utilização de cargas adicionadas ao corpo. Os animais foram submetidos ao treinamento durante 20 sessões, sendo que foram treinados por cinco dias consecutivos, seguidos por dois dias de descanso (60 minutos cada sessão, 5 dias/semana, durante 4 semanas). Após a natação as ratas eram secas com jato de ar quente e devolvidas à gaiola.

3.5 Avaliação óssea – Tíbias direita e esquerda

No final do período de experimentação as ratas foram submetidas à eutanásia com dose letal de tiopental injetado intraperitonealmente. Em seguida, os membros pélvicos foram abordados, e as tíbias direita e esquerda retiradas e limpas das partes moles adjacentes. As tíbias esquerdas foram destinadas ao exame densitométrico e ao ensaio mecânico, sendo envolvidas em gaze umedecida em soro fisiológico e estocadas em “freezer” (-20° C). As tíbias direitas foram destinadas ao exame histológico e fixadas em formol neutro por 24 horas para depois serem processadas como descrito adiante.

3.6 Densitometria Óssea

Nas tíbias esquerdas de todos os animais foi determinada a densidade mineral óssea (DMO) realizada no Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). O método usado foi por absorimetria de raios X de dupla energia (DXA), com o densitômetro modelo DPX ALPHA LUNAR® de alta resolução, Smartscan, versão 4.7, Madison, Wisconsin, EUA, e “software” especial para pequenas amostras.

Para esse exame, primeiramente, os ossos foram identificados e posicionados no fundo de um recipiente com soro fisiológico, a 2,0 cm de profundidade, alinhados e escaneados em conjunto (Figura 9).

Figura 9. À esquerda, equipamento densitômetro modelo DPX ALPHA LUNAR. À direita, alinhamento das tíbias no fundo do recipiente com soro fisiológico para escaneamento e obtenção da DMO.

As imagens foram capturadas e, mais tarde, delineadas para obtenção da densidade mineral óssea, obtida em g/cm^2 , que foi medida em área do terço proximal da tíbia, medida desde a extremidade proximal do osso até a tuberosidade anterior (Figura 10).

Figura 10. Imagens obtidas com o escaneamento das tíbias, para medida da densidade mineral óssea.

3.7 Ensaio Mecânico

Após obtenção da DMO, os ossos retornaram para o “freezer” (-20°C). Vinte e quatro horas antes do ensaio mecânico foram retirados e mantidos em refrigerador comum. Algumas horas antes de serem ensaiados foram mantidos em temperatura ambiente, para entrar em equilíbrio térmico com o meio, ainda envolvidos em gases umedecidas em soro fisiológico.

3.7.1 Ensaio de flexão em três pontos

Para os ensaios mecânicos foi utilizada a máquina universal de ensaio EMIC DL10000 (São José dos Pinhais, Brasil), do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com célula de carga de 50 Kgf. A velocidade de aplicação da carga foi de 1mm/min, pré-carga de 5,0 N e tempo de acomodação de 30 segundos.

A tíbia esquerda foi submetida à flexão simples em três pontos, sobre um suporte metálico com 25,0 mm de separação entre os dois apoios, e uma força vertical foi aplicada no centro da diáfise, sobre a face posterior do osso até ocorrer fratura (Figura 11).

As curvas força x deformação de cada ensaio foram registradas em tempo real, e, por meio do *software Tesc®* (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil), obtidos os valores da força no limite máximo (FM) e rigidez (R).

Todos os ensaios foram realizados em condições semelhantes e, durante todos eles, os ossos foram mantidos umedecidos em soro fisiológico.

Figura 11. Posicionamento da tíbia no suporte para realização do ensaio de flexão em três pontos. A tíbia ficava apoiada em dois suportes metálicos com 25,0 mm de afastamento entre si e a força vertical foi aplicada no centro da diáfise, na face posterior do osso.

3.8 Processamento Histológico

As tíbias direitas, após fixação em formaldeído por 24 horas foram descalcificadas em EDTA 0,5 M, cerca de 30 dias, com trocas das soluções a cada dois dias. Depois, foram desidratados em série crescente de soluções de álcool etílico: 70%, 90%, 95%, álcool absoluto I, II e III (1 hora em cada concentração).

Feito isso, os blocos ósseos foram processados para inclusão em parafina. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura, no plano frontal ligeiramente inclinado para a lateral, em microtomo Leica RM 2165 (Alemanha) e, depois, coloração com tricrômico de Masson. Foi realizada análise quantitativa do osso trabecular, na região proximal da tíbia com o Programa Axiovision (Zeiss, Alemanha), instalado na Z2 microscopia AxioImager (Zeiss, Alemanha), com

aumento real de 50 vezes. Para cada animal foram avaliados 12 campos histológicos de tecido ósseo trabecular.

3.9 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados os programas Graph Pad e Prisma versão 5.00 (San Diego, USA). A comparação do peso corporal foi realizada para verificar a sua variação após os procedimentos experimentais. Para comparação do peso no início e final da suspensão no grupo suspenso (S) e no grupo controle I (CI), foi utilizado o teste *t* de *Student* pareado, indicado quando os dados amostrais projetam populações normalizadas (85). Na comparação do peso inicial, final da suspensão e início da liberação ou treinamento e ainda final da liberação ou treinamento no grupo suspenso e treinado (ST), controle (CII) e suspenso não treinado (SNT), foi utilizada a estatística não paramétrica de *Kruskal-Wallis* pelo fato de se tratar da comparação de um mesmo grupo em três situações distintas.

Para realizar análise estatística nos dados das propriedades mecânicas e da densitometria óssea, foi utilizada a estatística *t* de *Student* para dados paramétricos na comparação entre os grupos S x CI. Para realizar a comparação entre os grupos ST x CII x SNT foi utilizada a análise de variância de *Fisher* (ANOVA) para um critério de classificação, com pós-teste de *Tukey*. O teste de normalidade utilizado foi o de *D'Agostino e Pearson* e a igualdade de variância foi verificada pelo teste de *Bartlett*. (86;87). Todos os valores foram considerados diferentes significativamente em $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram usados 50 animais e todos completaram o período de estudo proposto, sem intercorrências importantes. Durante o período foram necessários pequenos ajustes no sistema de suspensão, com reforço da fixação da espuma adesiva ou sua substituição, sempre mantendo os membros pélvicos sem apoio.

4.1 Peso corporal

O peso corporal médio inicial dos animais do grupo S (suspensão) foi de 249,20 g e, após 21 dias de suspensão, houve diminuição significativa (-11,39%, $p < 0.0001$) para 220,80 g. No grupo CI (controle I) o peso médio inicial de 252 g teve aumento significativo (+12,10%, $p < 0.0001$), após 21 dias (282,50 g).

Os animais do grupo CII (controle II) com média de peso inicial 252,50 g apresentaram aumento significativo (+6,09%, $p = 0,0023$) de peso corporal (267,90 g) nos primeiros 21 dias e, pelos próximos 30 dias ganharam significativamente (+16,79%, $p < 0.0001$) com peso médio de 312,90 g.

Para o grupo SNT (suspensão não treinado) em relação ao peso médio inicial (255,20 g), houve perda significativa (-13,98%, $p < 0.0001$) após o período de suspensão (219,50 g) e, com a liberação eles aumentaram significativamente o peso (+24,23%, $p < 0.0001$), ou seja, recuperaram o peso perdido (272,70 g).

No grupo ST (suspensão e treinado) a média de peso inicial foi de 252,30 g, e após perderem significativamente (-15,45%, $p < 0.0001$) o peso corporal (213,30 g) com a suspensão, aumentaram significativamente (+35,53%, $p < 0.0001$) com o treinamento de natação (289,10 g).

A Tabela 1 apresenta os valores médios do peso corporal após cada período experimental com os respectivos desvio padrão e % de perda ou ganho de peso.

Tabela 1. Peso corporal médio dos animais (g) e desvio padrão no início e final de cada fase experimental.

		Período de análise			
Grupos experimentais		Início da suspensão	Final da suspensão (21 dias): início da liberação/ treinamento	Final da liberação ou treinamento (30 dias)	
CI	Média	252,00	282,50		
	d.p.	3,59	+12.10% (p<0.0001)	8,40	
S	Média	249,20	220,8		
	d.p.	1,40	-11.39% (p<0.0001)	7,93	
CII	Média	252,50	267,90	312,90	
	d.p.	10,10	+6.09% (p=0.0023)	9,31	+16.79% (p<0.0001)
SNT	Média	255,20	219,50	272,70	
	d.p.	9,82	-13.98% (p<0.0001)	17,71	+24.23% (p<0.0001)
ST	Média	252,30	213,30	289,10	
	d.p.	6,04	-15.45% (p<0.0001)	10,38	+35.53% (p<0.0001)

CI= grupo controle; S= suspenso por 21 dias; CII= grupo controle II; SNT= suspenso por 21 dias sem treinamento; ST= suspenso por 21 dias e treinado com 20 sessões de natação. d.p.= desvio padrão

4.2 Propriedades Mecânicas

Os valores de força máxima e rigidez, para todos os grupos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios de força máxima e rigidez da tíbia esquerda das ratas nos diferentes grupos

Propriedades mecânicas		GRUPOS				
		CI (n=10)	S (n=10)	CII (n=10)	SNT (n=10)	ST (n=10)
Força Máxima (N)	Média	41,97	36,08^a	48,36^b	41,40^c	46,12^d
	d.p.	4,15	4,42	4,57	3,77	3,08
Rigidez (N/mm)	Média	58,64	45,93^e	72,93^f	54,55^g	69,85^h
	d.p.	7,84	11,84	8,99	10,88	10,37

CI= grupo controle; S= suspenso por 21 dias; CII= grupo controle II; SNT= suspenso por 21 dias sem treinamento; ST= suspenso por 21 dias e treinado com 20 sessões de natação. d.p.= desvio padrão.

^a p=0,0003 vs CI ; ^b p≤0,05 vs SNT ; ^c p≤0,05 vs ST; ^d p>0,05 vs CII; ^e p=0,0055 vs CI ; ^f p<0,005 vs SNT; ^g p<0,001 vs ST; ^h p>0,05 vs CII

4.2.1 Força Máxima

Para o grupo suspenso, a força máxima ($36,08 \pm 4,42$) N foi significativamente menor (-14,03%, p=0,0003) em comparação com o seu controle (CI) ($41,97 \pm 4,15$) N.

A comparação simultânea da força máxima entre os grupos avaliados após 51 dias (CII x SNT x ST) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,001).

No grupo ST a análise dos resultados foi significativamente maior (+10,23%, p≤0,05) na força máxima ($46,12 \pm 3,08$) N em comparação com o grupo SNT ($41,40 \pm 3,77$) N. O grupo SNT apresentou resultado significativamente menor (-14,4%, p≤0,005) em comparação com o grupo CII ($48,36 \pm 4,57$) N.

Finalmente, a comparação entre os grupos ST e CII não apresentou diferença estatística significativa (p>0,05) (Figura 12).

Figura 12. Comparação da força máxima entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspensão pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspensão pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspensão pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.

4.2.2 Rigidez

Para o grupo suspenso, a rigidez ($45,93 \pm 11,84$) N/mm foi significativamente menor (-21,68%, $p=0,0055$) em comparação com controle (CI) ($58,64 \pm 7,84$) N/mm.

Entre os grupos CII x SNT x ST, houve diferença estatística significativa ($p=0,001$).

No grupo ST a análise dos resultados foi significativamente maior (+21,91%, $p<0,001$) na rigidez ($69,85 \pm 10,37$) N/mm em comparação com o grupo SNT ($54,55 \pm 10,8$) N/mm. O grupo SNT, apresentou resultado significativamente menor (-25,21%, $p<0,0055$) em comparação com o seu controle (CII) ($72,93 \pm 8,99$) N/mm.

A comparação da rigidez entre os grupos ST e grupo CII não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) (Figura 13).

Figura 13. Comparação da rigidez entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspenso pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspenso pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspenso pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.

4.3 Densitometria Óssea (DXA)

Os valores da Tabela 3 representam a média da densidade mineral óssea (DMO) em g/cm^2 em todos os grupos experimentais.

Tabela 3. Valores médios da densidade mineral óssea obtidos pela análise realizada na tíbia esquerda de todos os grupos.

Osso		Grupos Experimentais				
		CI (n=10)	S (n=10)	CII (n=10)	SNT (n=10)	ST (n=10)
Tíbia esquerda (g/cm ²)	Média	0,176	0,145 ^a	0,210 ^b	0,182 ^c	0,201 ^d
	d.p.	0,0209	0,0199	0,0121	0,127	0,0183

CI= grupo controle; S= suspenso por 21 dias; CII= grupo controle II; SNT= suspenso por 21 dias sem treinamento; ST= suspenso por 21 dias e treinado com 20 sessões de natação. d.p. = desvio padrão.

^a p=0,019 vs CI ; ^b p<0,05 vs SNT ; ^c p<0,05 vs ST; ^d p>0,05 vs CII

A DMO na região metafisária proximal da tíbia no grupo S (0,145 g/cm²±0,0199) foi significativamente menor (-17,62%, p=0,019) comparado com o grupo CI (0,176 g/cm² ±0,0209).

A comparação simultânea entre os três grupos avaliados por 51 dias (ST x CII x SNT) foi estatisticamente diferente (p 0,0095).

N grupo ST a análise dos resultados foi significativamente maior (9,46%, p<0,05) na DMO (0,201 g/cm² ±0,0183), em comparação com o grupo SNT (0,182 g/cm² ±0,0127). No grupo SNT, a DMO apresentou resultado significativamente menor (-13,34%, p<0,05), em comparação com seu controle (CII) (0,210 g/cm² ±0,0121).

Finalmente, a comparação da DMO entre os grupos ST e o grupo controle CII não apresentou diferença estatística significativa (p>0,05) (Figura 14).

Figura 14. Comparação da densidade mineral óssea entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspenso pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspenso pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspenso pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.

4.4 Histomorfometria

4.4.1 Análise qualitativa

O grupo suspenso (S), após o início do experimento apresentou ossos com características histológicas compatíveis com osteopenia, caracterizada por trabéculas ósseas mais delgadas e em uma quantidade aparente muito menor, tanto na epífise, quanto na metáfise. No grupo S a diáfise apresentou uma redução aparente na espessura do tecido ósseo compacto e grande redução na quantidade de tecido ósseo esponjoso em sua porção mais interna, ou seja, próxima do canal medular (Figura 15).

Figura 15. Aspectos histológicos representativos nas regiões da epífise, metáfise e parte da diáfise dos grupos: Controle I (CI) sem suspensão e do grupo Suspensão (S). A-B: vista panorâmica da peça. C-D: fotomicrografias do centro da epífise e aspecto do osso trabecular. Observar que o grupo suspensão apresentou trabéculas ósseas bem mais delgadas e em menor número, quando comparado com o grupo CI. Coloração: Tricrômico de Masson. A-B, barras de escala: 1500 μm ; aumento original 2x; C-D, barras de escala: 140 μm ; aumento original 160x.

No tecido ósseo da epífise e da metáfise havia uma delgada camada de tecido ósseo compacto, e no seu interior uma rica rede de trabéculas ósseas. A espessura aparente do tecido ósseo compacto se mostrou similar nos diferentes grupos. Todavia, a espessura aparente e a quantidade aparente de trabéculas do osso esponjoso diferiram expressivamente nos diferentes grupos. O grupo ST apresentou uma aparente maior quantidade de trabéculas ósseas, bastante delgadas, ao passo que o grupo CII apresentou, comparativamente, uma menor quantidade de trabéculas ósseas, bem mais espessadas. Comparado a estes últimos, o grupo SNT apresentou menor quantidade de trabéculas ósseas com espessura delgada. O tecido ósseo compacto da diáfise apresentou espessura e características estruturais similares nos grupos ST e CII. Uma extensão bastante discreta de tecido ósseo esponjoso revestido pelo endóstio foi observada na porção interna da diáfise em todos os grupos (Figura 16).

Figura 16. Aspectos histológicos das regiões do fragmento proximal da tíbia no grupo CII (controle II), do grupo ST (suspensão treinado) e grupo SNT (suspensão não treinado), todos avaliados 51 dias após o início do experimento. A-C: fotomicrografias de vista panorâmica da epífise, metáfise e parte da diáfise. D-F: fotomicrografias da região central da metáfise mostrou o aspecto do osso trabecular. O grupo CII (D) apresentou trabéculas ósseas espessas e em grande número; o grupo ST apresentou trabéculas ósseas delgadas e em grande número, e o grupo SNT trabéculas ósseas delgadas e em menor número. Coloração: Tricrômico de Masson (TM). A-C, barras de escala: 1500 µm; aumento original 2x; D-F, barras de escala: 140 µm; aumento original 160x.

4.4.2 Análise quantitativa (%)

Os valores da Tabela 4 representam a média do percentual de osso esponjoso nos grupos experimentais.

Tabela 4. Percentual de osso esponjoso

% de osso esponjoso		Grupos Experimentais				
		CI	S	CII	SNT	ST
		(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
Tíbia direita	Média	46,28	19,81^a	47,37^b	22,71^c	44,37^d
(%)	d.p.	7,71	1,3	4,85	8,07	2,70

CI= grupo controle; S= suspenso por 21 dias; CII= grupo controle II; SNT= suspenso por 21 dias sem treinamento; ST= suspenso por 21 dias e treinado com 20 sessões de natação. d.p. = desvio padrão.

^a p=0,0001 vs CI ; ^b p<0,001 vs SNT ; ^c p<0,001 vs ST; ^d p>0,05 vs CII

O conteúdo do osso esponjoso na região metafisária proximal da tíbia no grupo S (19,81%) foi significativamente menor (-57,2%, p=0,0001) em comparação ao grupo CI (46,28%).

A comparação simultânea entre os grupos avaliados após 51 dias (CII x SNT x ST) apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos (p<0,0001).

No grupo ST a análise dos resultados foi significativamente maior (48,82%, p<0,001) no percentual de osso esponjoso (44,37%) em comparação com o grupo SNT (22,71%). O grupo SNT (22,71%), apresentou resultado significativamente menor (-52,06%, p<0,001) em comparação com o grupo CII (47,37%).

A comparação do percentual de osso esponjoso entre o grupo ST e o grupo CII não apresentou diferença estatisticamente significante (p>0,05) (Figura 17).

Figura 17. Comparação do percentual de osso esponjoso entre os diferentes grupos (CI= controle I, S=suspensão pela cauda por 21 dias, CII= controle 51 dias, SNT= suspensão pela cauda 21 dias e não treinado, e ST= suspensão pela cauda por 21 dias e treinados com natação. O intervalo de linha vertical expressa o desvio padrão.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O tecido ósseo é sensível à solicitação mecânica (88) e responde tanto ao aumento da demanda, tornando-se mais resistente, quanto a situações de hipoatividade que podem causar efeitos deletérios levando ao enfraquecimento do esqueleto. Um dos principais estímulos para a remodelação óssea é a força da gravidade (89). É interessante notar que a perda de massa óssea sob efeito de menor gravidade, como experimentado por astronautas, pode ser classificada como osteoporose (90). Essa perda resulta em alterações na massa óssea e afeta diretamente as propriedades mecânicas do osso (91). O sedentarismo e algumas doenças incapacitantes, também reduzem o estímulo mecânico e, conseqüentemente, também levam à piora da qualidade óssea. O melhor conhecimento dos efeitos da hipoatividade pode ser útil para estabelecer medidas de prevenção ou tratamento da osteopenia nas pessoas em risco como o idoso, o lesado medular, o acamado e mesmo astronautas (11;90;92).

O papel do exercício e de estímulos mecânicos em promover hipertrofia em tecidos como o músculo já foram bem estudados, porém o papel do exercício físico e de estímulos mecânicos na qualidade do tecido ósseo, como realizado nesta investigação, ainda não foi suficientemente caracterizado na literatura. A compreensão do relacionamento entre a atividade física, por meio do tipo de exercício adequado e a qualidade óssea é importante para criar estratégias de recuperação ou preservação da saúde (61;92).

Assim, o objetivo da presente investigação surgiu do interesse em avaliar a eficácia de um programa de natação na recuperação da qualidade óssea em um osso longo típico, como a tíbia de ratas em que foi induzida a osteopenia pelo modelo de suspensão pela cauda.

A melhora da força muscular é potencialmente um dos meios mais eficazes de reduzir quedas e incidência de fraturas nos idosos. Além disso, combate a osteopenia/osteoporose e melhora a velocidade de marcha (93). Após confirmação do diagnóstico de osteoporose, o impacto e a intensidade do exercício físico devem ser controlados, a fim de evitar a ocorrência de fraturas decorrentes do próprio exercício.

A atividade física é um dos principais métodos não farmacológicos para o aumento e manutenção da densidade mineral óssea (94). O exercício de salto pode ser um aliado na melhora da qualidade óssea. Umemura et al. (95) relataram melhora nas propriedades mecânicas em ossos de ratas. O exercício com salto em animais submetidos à suspensão pela cauda pode causar um efeito positivo em relação à osteopenia (60). O tempo de execução desse exercício pode ser menor, comparado a outras modalidades físicas, porém há de se considerar que o salto é um exercício de difícil execução em pacientes com osteoporose ou idosos, vez que oferece riscos de quedas durante o treinamento.

Pichler et al. (96) relataram o exercício de vibração como uma maneira nova para prevenir a osteoporose e a atrofia muscular. Este método pode ser uma alternativa para a melhora da saúde óssea. No entanto, é necessário uma melhor compreensão dos seus mecanismos fisiológicos (97). Tezval et al. (98) relataram o efeito da vibração vertical (corpo inteiro) sobre a qualidade do osso femoral em ratos osteopênicos. Os autores observaram melhora nas propriedades mecânicas e nos parâmetros histomorfométricos dos ossos nos animais tratados.

A natação, ou mais amplamente a atividade aquática, é uma atividade mais protegida e adaptável, podendo ser realizada com pessoa com deficiências motoras, circulatórias ou respiratórias. É lúdica e atua globalmente com efeitos positivos sobre a musculatura, o sistema cardiorrespiratório, imunológico e emocional.

Os principais mecanismos fisiológicos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea podem ser investigados em animais, principalmente no rato que se apresenta como modelo adequado para o estudo da osteopenia e osteoporose nos seus diferentes aspectos (33;37). Além disso, são animais resistentes, de fácil manipulação, aprendizado e com capacidade inata para a natação (99).

O método de suspensão do rato pela cauda foi aperfeiçoado por Morey-Holton et al. (41) como modelo experimental para simular os efeitos da microgravidade experimentados por astronautas, mas depois tornou-se um modelo padrão para o estudo da osteopenia causada por hipoatividade. O método permite boa adaptação do animal, avalia os efeitos da ausência de força mecânica sobre o esqueleto, bem como propicia a aplicação de medidas de reabilitação adequadas ao enfraquecimento ósseo (33;46). É considerado um modelo válido principalmente para análise de alterações músculo esqueléticas (100).

Uma das dificuldades do sistema de suspensão é a graduação da tensão de enfaixamento na cauda do animal, pois pode levar à necrose ou lesões cutâneas da cauda se demasiadamente apertado ou permitir o escape do animal, se estiver frouxo. Por isso, diferentes sistemas de fixação da cauda foram estudados na tentativa de buscar a técnica ideal. No processo de preparação do animal para a suspensão alguns autores usaram anestesia e realizaram o envolvimento da cauda com espuma adesiva e, em seguida, aplicaram bandagem elástica, de modo a envolver toda a espuma (52;58). Descreveram que esse sistema é de fácil execução, porém a extremidade da cauda do animal pode requerer amputação profilática no sentido de prevenir necrose, o que aumenta o estresse.

No intuito de prevenir possíveis complicações cutâneas, a técnica de suspensão pode ser realizada com a tração esquelética da vértebra da cauda do animal, ao invés da pele. A técnica foi desenvolvida por Falcai et al. (54), mas é mais invasiva que a tração cutânea e só se justifica para tempos de observação mais longos que três semanas, quando aumentam muito as complicações com o uso do sistema cutâneo (54;56).

Nesta investigação foi usado o sistema de suspensão pela cauda, com algumas modificações em relação ao sistema de suspensão comumente usado no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que adota, basicamente o sistema de Morey-Holton (37). Primeiro, para o preparo da cauda, os animais foram contidos, com uma toalha, o que diminui o estresse, pois evita a sedação. Segundo, foi aplicada espuma de poliuretano sem envolver toda a cauda, o que garantiu a circulação e preveniu complicações como necrose. Além disso, este sistema mostrou-se ser bastante adequado, pois não houve casos de soltura, lesões cutâneas ou morte do animal durante o período de suspensão.

Foi utilizado o período de 21 dias de suspensão, pois ele é suficiente para causar osteopenia (37;41;48;52;54;89) (37;41;48;52;54;89), o que foi comprovado pelos nossos resultados. Com base no trabalho de Hargens et al. (50), os animais devem permanecer com ângulo de inclinação do tronco de 30° o que propicia apoio adequado aos membros torácicos para movimentação dentro da gaiola para a busca de alimento e água e deixa livres de apoio os membros pélvicos.

Todos os animais foram avaliados quanto ao peso corporal, pois é parâmetro de fácil determinação, que reflete a saúde do animal. A posição de

suspensão pela cauda, embora bem tolerada, não deixa de interferir com atividade e leva a uma situação de estresse, ou desconforto, com a consequente diminuição de peso.

Os animais dos grupos controle (CI, CII) apresentaram ganho de peso, enquanto que aqueles suspensos (grupo S, ST, SNT) apresentaram diminuição do peso no final da suspensão, confirmando os resultados de Lecoq et al. (101) que constataram perda de -16% de peso corporal em ratos mantidos em suspensão. Entretanto, em nossos animais, após o período de liberação na gaiola ou treinamento houve aumento estatisticamente significativo do peso corporal, ou seja, recuperação.

Em resumo, quanto à análise do peso, o animal inicialmente, resente-se bastante da nova condição que lhe é imposta, mas depois se estabiliza, recuperando-se após a liberação.

Em relação ao aparelho locomotor, a hipoatividade causada pela suspensão atinge predominantemente os membros pélvicos, especialmente o fêmur e a tíbia. Mesmo para cada osso o acometimento não é homogêneo e afeta mais as regiões com maior componente de osso esponjoso, ou seja, as regiões metafisárias e epifisárias, e, com menor envolvimento, a diáfise (58;102). Estes achados justificam a realização da densitometria e a histomorfometria na extremidade proximal da tíbia, onde predomina o osso esponjoso que, por seu maior metabolismo, responde mais rapidamente, tanto às condições adversas, quanto aquelas favoráveis (58).

O enfraquecimento ósseo pode ser comprovado através das alterações nas propriedades mecânicas dos ossos (103), uma vez que nessas condições o osso sofre fraturas sob a ação de cargas menores. Estudos publicados durante décadas confirmaram a relação entre qualidade óssea e as propriedades mecânicas (58;91;104;105).

Os parâmetros avaliados no presente estudo nos animais suspensos por 21 dias mostraram que houve deterioração significativa na qualidade óssea. Essas conclusões podem ser observadas pela comparação dos dados do grupo CI (controle I) e o grupo S (suspensão) ao final de 21 dias. Estes resultados confirmam investigações anteriores, que mostram que a hipoatividade leva rapidamente à osteopenia (54;58). Além disso, a boa tolerância dos animais ao sistema de suspensão valida a adequação do modelo.

Os resultados histológicos e da DMO avaliaram o osso trabecular e o teste mecânico refletiu o comportamento do osso como um todo. Entretanto, como a força foi aplicada no centro do osso e a fratura aí ocorreu, é razoável supor que as propriedades mecânicas obtidas refletem mais o osso compacto (que predomina na região) do que o osso esponjoso (que predomina nas extremidades). A força máxima representa o ponto de falência do osso, enquanto a rigidez mostra como ocorre a deformação do osso até a fratura. Esses dois parâmetros também foram significativamente menores nos animais que estavam suspensos durante 21 dias. Assim, tanto o osso esponjoso como o compacto foram afetados pela hipoatividade. Entretanto, não foi possível fazer uma análise comparativa entre os dois tipos de osso (100;106;107).

O papel do exercício e de estímulos mecânicos na promoção da saúde estão bem estabelecidos. Entretanto, se o efeito de atividades físicas que envolvem impacto sobre o osso parece lógico, o mesmo não é verdadeiro em relação à natação porque ela não envolve a descarga de peso ou impacto. Existe até mesmo alguma controvérsia sobre o efeito positivo da natação sobre o esqueleto, embora esta suposição não tenha sido comprovada em humanos (108).

No presente estudo a natação foi selecionada como programa de reabilitação, por suas características positivas (15;77;81). O protocolo proposto foi adaptado a partir do utilizado por Ueno et al. (84) e Huang et al. (75), porém sem cargas adicionais. Todos os animais se adaptaram bem ao treinamento, movimentaram-se de maneira adequada, não houve intercorrências e, aparentemente, sem diferenças nos animais que haviam cumprido o período de suspensão e os demais, quando colocados a nadar.

Os resultados do presente estudo mostraram que a natação foi capaz de reverter as condições osteopênicas causadas pela hipoatividade de maneira mais rápida e mais completa do que a atividade regular na gaiola. Além disso, houve melhora de todos os parâmetros de qualidade com a natação, sugerindo que tanto o osso esponjoso, como lamelar se beneficiaram com a intervenção.

Experimentalmente, a efetividade do exercício de natação na manutenção ou melhora da integridade óssea é controversa. Huang et al. (64) não encontrou diferença na DMO de ossos de animais submetidos à natação, o que pode ter ocorrido em virtude da frequência e quantidade de sessões utilizadas. Mas, Melton

et al. (78) constataram que os exercícios de natação podem melhorar a densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas,.

Como a natação não envolve impacto e diminui o efeito da força da gravidade, parece ser razoável supor que seu efeito positivo sobre a qualidade óssea mostrado pelos nossos dados ocorreu em virtude da atividade muscular que está aumentada durante a atividade aquática. Existe forte associação entre massa óssea e força muscular (71;72). Idosos desnutridos apresentaram maior prevalência de osteoporose e menor força muscular. Além disso, apresentam risco maior de sofrer quedas e fraturas relacionadas à osteoporose (109). Assim, aumento da massa muscular reflete-se no aumento da massa óssea, ou seja, os músculos, uma vez estimulados, irão aumentar a osteogênese, tanto no local de aplicação da inserção muscular, quanto à distância.

Esse mecanismo pode ser explicado pela mecanotransdução, que se refere ao meio pelo qual uma célula ou um tecido respondem biologicamente a um estímulo mecânico. No osso ele permite que estímulos mecânicos aplicados por meio da força da gravidade, impacto, vibração, ação muscular e outros esforços interfiram na osteogênese e na microestrutura. É por este mecanismo que a estrutura óssea se adapta às demandas funcionais exercidas de modo a interferir na neoformação óssea. Os elementos mediadores entre o estímulo mecânico e a célula responsiva ocorrem em vários níveis e não estão completamente esclarecidos. De acordo com Duncan & Turner (14) o processo pode ser dividido em quatro etapas: mecanoacoplamento (transdução de uma força mecânica aplicada ao osso em sinal mecânico local percebido por um osteócito), acoplamento bioquímico (transdução de sinal mecânico local em sinal bioquímico), transmissão de sinal de uma célula sensível a uma célula efetora (osteoblasto ou osteoclasto), resposta da célula efetora (em nível tecidual, reabsorvendo ou formando tecido ósseo). Logo, os osteócitos parecem ser os principais mecanossensores do osso (14), liberando mediadores bioquímicos como prostaglandinas que regulam a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (110). Acredita-se que, após a deformação mecânica da membrana plasmática, ocorra uma alteração conformacional das integrinas, criando em sua estrutura química sítios de alta afinidade para reações químicas. As integrinas são proteínas cuja principal função é integrar o interior da célula com seu

exterior. De fato, o estímulo mecânico atua como uma enzima que catalisa a reação bioquímica (13).

A transmissão para a célula efetora é realizada por muitas substâncias, entre as quais o ácido nítrico, prostaglandinas E e I, esclerostina, IGFs, TGFbeta, RANK-I e OPG (111). Mesmo as células não afetadas diretamente pela força mecânica exibem resposta semelhante às aquelas que foram deformadas, por meio das *gap junctions* que são canais de comunicação intercelular que permitem a passagem de pequenas moléculas entre células adjacentes (112), usando o sistema microcanalicular. As células alvo finais são várias, mas principalmente osteoblastos e osteoclastos.

Existem diversos trabalhos que preconizam a utilização de cargas durante a realização de exercícios em ratos (17;64;67). A maior parte das intervenções recomenda exercícios resistidos com sobrecargas progressivas e exercícios com impacto que seriam as formas mais eficazes para melhora e manutenção do tecido ósseo. Nesta investigação foi observada melhora nas propriedades mecânicas de ossos estimulados com exercício de natação, mesmo sem cargas adicionais. Foi optado pela não utilização da carga porque os animais suspensos já vinham de uma situação desfavorecida representada por hipotrofia muscular e peso corporal menor, e o peso adicionado poderia levá-los à exaustão.

Outras variáveis podem ser estudadas de forma comparativa e progressiva, como duração do programa de exercício e tempo de exercício, o que poderá fornecer informações sobre o desenvolvimento de terapias.

Algumas comparações já foram feitas em relação à natação e a corrida em relação à resistência mecânica do osso de ratos e, embora ambas atividades tenham exercido efeito positivo sobre o osso, os autores concluíram que mais pesquisa seria necessária para avaliar exatamente a eficiência da natação (64;74).

Da mesma maneira, esta pesquisa pode ser complementada com a comparação do desempenho da natação com outras formas de aplicação de estresses no esqueleto, como corrida, vibração e salto. Contudo, como apresentado no início desta discussão, do ponto de vista clínico em humanos, a natação pode ter indicações específicas, levando em consideração as características físicas da população alvo (pessoas debilitadas, sequelas neurológicas, doenças degenerativas, idosos, etc.). Porém, simplesmente a constatação de seu efeito

positivo na saúde óssea já é um achado importante. Os dados do presente estudo mostraram que o grupo ST (suspenso treinado) e o grupo CII (controle II) não apresentaram diferença estatística entre eles, o que nos sugere que o protocolo de exercício sugerido, nesta investigação foi capaz de recuperar completamente a qualidade óssea.

Entretanto, esta pesquisa apresenta limitações que não permitem a extrapolação direta dos achados para a prática clínica. Primeiro, é difícil estabelecer se o mecanismo de nadar do rato é exatamente igual ao do ser humano. Com efeito, a natação é uma atividade instintiva no rato e, neste animal, a relação entre volume do corpo e tamanho dos membros não é a mesma do ser humano, o que leva a inferir que os esforços despendidos para nadar não sejam os mesmos. Segundo, não é possível estabelecer se o regime de natação empregado aqui para o rato pode ser transferido diretamente para o ser humano. Provavelmente, não. Além disso, mesmo o regime proposto para o treinamento de natação no rato, apesar de usar protocolos estabelecidos, tem base essencialmente empírica. Em humanos, a natação como prática física competitiva está bastante padronizada e estudada pela medicina do esporte, mas não como processo terapêutico para aquele paciente que, por alguma razão desenvolveu osteopenia ou osteoporose. Sob este aspecto, apenas pesquisas realizadas diretamente com seres humanos, trabalhando segundo vários regimes de treinamento, poderiam estabelecer o melhor esquema de treinamento para, depois, ser aplicado especificamente a cada paciente, tendo em consideração seu perfil.

Uma vez que forças intensas podem ser geradas na água com movimentos vigorosos, a atividade aquática deve ser executada sob supervisão adequada. Os exercícios de natação proveem o esforço mecânico necessário para estimular a formação óssea e minimizar a osteopenia por desuso, ou seja, preparar o organismo para que não ocorram lesões e a consequente piora do quadro decorrente da hipoatividade.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A piora da qualidade óssea causada na tíbia de ratas suspensas pela cauda foi revertida para valores normais com a natação, e mais completamente que a atividade espontânea apresentada pelo rato suspenso e depois colocado em gaiola.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- (1) Del FA, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:2302-21.
- (2) Kawai M, de Paula FJ, Rosen CJ. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. *J Intern Med* 2012 Oct;272(4):317-29.
- (3) Ross MH, Rowrell LJ. Osso. *Histologia texto e atlas*. 2a ed. São Paulo: Panamericana; 1993. p. 141-79.
- (4) Spence A.P. Sistema esquelético. *Anatomia Humana Básica*. 2a ed. São Paulo: Manole; 1991. p. 95-107.
- (5) Chen X, Tian HM, Pei FX, Yu XJ. Bone functions as a novel endocrine organ in energy metabolism. *Chin Med J (Engl)* 2012 Nov;125(22):4117-21.
- (6) Aires MM, Bianco AC, Castro ML. *Fisiologia do metabolismo osteomineral*. Fisiologia. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 1137-63.
- (7) Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006 Oct;3(10):7-15.
- (8) Vieira JGH. Conceitos gerais sobre o metabolismo de cálcio. *Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 611-4.
- (9) Lian JB, Stein GS. Osteoblast Biology. *J Osteoporosis* 1996;23-59.
- (10) Christiansen P. The skeleton in primary hyperparathyroidism: a review focusing on bone remodeling, structure, mass, and fracture. *APMIS Suppl* 2001;(102):1-52.
- (11) Cowin SC. On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone* 1998 May;22(5 Suppl):119S-25S.
- (12) Kunnel JG, Gilbert JL, Stern PH. In vitro mechanical and cellular responses of neonatal mouse bones to loading using a novel micromechanical-testing device. *Calcif Tissue Int* 2002 Dec;71(6):499-507.
- (13) De Gusmão C, Belangero W. Como a célula reconhece o estímulo mecânico? *Rev bras ortop* 2009;44(4):299-305.
- (14) Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995 Nov;57(5):344-58.
- (15) Smith R. Bone physiology and the osteoporotic process. *Respir Med* 1993 Feb;87 Suppl A:3-7.

-
- (16) Ohira Y, Kawano F, Wang XD, Sudoh M, Iwashita Y, Majima HJ, et al. Irreversible morphological changes in leg bone following chronic gravitational unloading of growing rats. *Life Sci* 2006 Jul 10;79(7):686-94.
 - (17) Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol* 2001 Oct;91(4):1663-8.
 - (18) Stark C, Nikopoulou-Smyrni P, Stabrey A, Semler O, Schoenau E. Effect of a new physiotherapy concept on bone mineral density, muscle force and gross motor function in children with bilateral cerebral palsy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2010 Jun;10(2):151-8.
 - (19) Kiratli BJ, Smith AE, Nauenberg T, Kallfelz CF, Perikash I. Bone mineral and geometric changes through the femur with immobilization due to spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev* 2000 Mar;37(2):225-33.
 - (20) Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res* 1990 Aug;5(8):843-50.
 - (21) Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 2006 Feb;38(2):257-64.
 - (22) Uhthoff HK, Sekaly G, Jaworski ZF. Effect of long-term nontraumatic immobilization on metaphyseal spongiosa in young adult and old beagle dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1985 Jan;(192):278-83.
 - (23) Cointry GR, Capozza RF, Ferretti JL, Frost HM. [Toward an anthropometric diagnosis of osteopenia and a biochemical diagnosis of osteoporoses]. *Medicina (B Aires)* 2003;63(6):737-47.
 - (24) Baiotto S, Labat B, Vico L, Zidi M. Bone remodeling regulation under unloading conditions: numerical investigations. *Comput Biol Med* 2009 Jan;39(1):46-52.
 - (25) Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone* 1997 May;20(5):385-91.
 - (26) White T, Smith BS. The efficacy of aquatic exercise in increasing strength. *Sports Med Training and Rehab* 1999;9(1):51-99.
 - (27) Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 1994 Nov;4(6):368-81.
 - (28) Lips P, van Schoor NM. Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005 May;16(5):447-55.

-
- (29) Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 1998;3(6):346-55.
 - (30) Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Dev* 2003 Mar;124(3):269-79.
 - (31) Bemben DA. Exercise interventions for osteoporosis prevention in postmenopausal women. *J Okla State Med Assoc* 1999 Feb;92(2):66-70.
 - (32) Kasper CE, White TP, Maxwell LC. Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J Appl Physiol* 1990 Feb;68(2):533-9.
 - (33) Kasper CE, McNulty AL, Otto AJ, Thomas DP. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: an empirical model. *Res Nurs Health* 1993 Aug;16(4):265-73.
 - (34) Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA, Davis TP. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. *J Appl Physiol* 1980 Mar;48(3):479-86.
 - (35) Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, Unsworth BR. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol* 1986 Jun;60(6):1946-53.
 - (36) Matsumoto T, Nakayama K, Kodama Y, Fuse H, Nakamura T, Fukumoto S. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. *Bone* 1998 May;22(5 Suppl):89S-93S.
 - (37) Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med* 2005;10:7-40.
 - (38) Morey ER. Spaceflight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness. *BioScience* 1979;29(3):168-72.
 - (39) Deavers DR, Musacchia XJ, Meininger GA. Model for antiorthostatic hypokinesia: head-down tilt effects on water and salt excretion. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1980 Oct;49(4):576-82.
 - (40) Stump CS, Overton JM, Tipton CM. Influence of single hindlimb support during simulated weightlessness in the rat. *J Appl Physiol* (1985) 1990 Feb;68(2):627-34.
 - (41) Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone* 1998 May;22(5 Suppl):83S-8S.

-
- (42) Wronski TJ, Morey-Holton ER. Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques. *Aviat Space Environ Med* 1987 Jan;58(1):63-8.
 - (43) Montufar-Solis D, Duke PJ, Morey-Holton E. The Spacelab 3 simulation: basis for a model of growth plate response in microgravity in the rat. *J Gravit Physiol* 2001 Dec;8(2):67-76.
 - (44) Saxena R, Pan G, Dohm ED, McDonald JM. Modeled microgravity and hindlimb unloading sensitize osteoclast precursors to RANKL-mediated osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 2011 Jan;29(1):111-22.
 - (45) Abram AC, Keller TS, Spengler DM. The effects of simulated weightlessness on bone biomechanical and biochemical properties in the maturing rat. *J Biomech* 1988;21(9):755-67.
 - (46) Desplanches D, Mayet MH, Sempore B, Flandrois R. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol* 1987 Aug;63(2):558-63.
 - (47) Jaspers SR, Tischler ME. Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. *J Appl Physiol* 1984 Nov;57(5):1472-9.
 - (48) Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1988 Nov;65(5):2318-25.
 - (49) Winiarskis AM, Rot RR, Alford EK, Chiang PC, Edgerton VR. Mechanical properties of rat skeletal muscle after hindlimb suspension. *Experimental Neurology* 1986;96:650-60.
 - (50) Hargens AR, Mortensen WW, Gershuni DH, Crenshaw AG, Lieber RL, Akeson WH. Long-term measurement of muscle function in the dog hindlimb using a new apparatus. *J Orthop Res* 1984;1(3):284-91.
 - (51) Lara MAP, Volpon JB. Algumas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas submetidas a um modelo de hipoatividade e tratadas com exercício [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2003.
 - (52) Silva AV, Volpon JB. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. *Acta Ortopédica Brasileira* 2004;12(1):22-31.
 - (53) Ferreira JA, Crissey JM, Brown M. An alternant method to the traditional NASA hindlimb unloading model in mice. *J Vis Exp* 2011;(49).
 - (54) Falcai MJ, Volpon JB. Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto; 2011.

-
- (55) Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, Dupre-Aucouturier S, Desplanches D, Gundersen K. No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *J Appl Physiol* 2012 Jul;113(2):290-6.
 - (56) Knox M, Fluckey JD, Bennett P, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. Hindlimb unloading in adult rats using an alternative tail harness design. *Aviat Space Environ Med* 2004 Aug;75(8):692-6.
 - (57) Maeda H, Kimmel DB, Raab DM, Lane NE. Musculoskeletal recovery following hindlimb immobilization in adult female rats. *Bone* 1993 Mar;14(2):153-9.
 - (58) Shimano MM, Volpon JB. Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. *Braz J Med Biol Res* 2009 Apr;42(4):330-8.
 - (59) Migliore A, Broccoli S, Massafra U, Cassol M, Frediani B. Ranking antireabsorptive agents to prevent vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis by mixed treatment comparison meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013 Mar;17(5):658-67.
 - (60) Ju YI, Sone T, Okamoto T, Fukunaga M. Jump exercise during remobilization restores integrity of the trabecular architecture after tail suspension in young rats. *J Appl Physiol* (1985) 2008 Jun;104(6):1594-600.
 - (61) Andreoli A, Monteleone M, Van LM, Promenzio L, Tarantino U, De LA. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2001 Apr;33(4):507-11.
 - (62) Creighton DL, Morgan AL, Boardley D, Brolinson PG. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *J Appl Physiol* 2001 Feb;90(2):565-70.
 - (63) Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner* 1994 Aug;26(2):133-40.
 - (64) Huang TH, Chang FL, Lin SC, Liu SH, Hsieh SS, Yang RS. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *J Bone Miner Metab* 2008;26(4):350-7.
 - (65) Bergstrom I, Landgren B, Brinck J, Freyschuss B. Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. *Osteoporos Int* 2008 Feb;19(2):177-83.
 - (66) Chien MY, Wu YT, Hsu AT, Yang RS, Lai JS. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000 Dec;67(6):443-8.

-
- (67) Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J Appl Physiol* 2003 Sep;95(3):1032-7.
- (68) Madsen KL, Adams WC, Van L. Effects of physical activity, body weight and composition, and muscular strength on bone density in young women. *Med Sci Sports Exerc* 1998 Jan;30(1):114-20.
- (69) Becker BE. Aquatic therapy: scientific foundations and clinical rehabilitation applications. *PM R* 2009 Sep;1(9):859-72.
- (70) Hoshi A, Watanabe H, Chiba M, Inaba Y. Bone density and mechanical properties in femoral bone of swim loaded aged mice. *Biomed Environ Sci* 1998 Sep;11(3):243-50.
- (71) Bayramoglu M, Sozay S, Karatas M, Kilinc S. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. *Rheumatol Int* 2005 Sep;25(7):513-7.
- (72) Renno AC, Silveira Gomes AR, Nascimento RB, Salvini T, Parizoto N. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. *Exp Gerontol* 2007 Jun;42(6):517-22.
- (73) Anderson JJ. The important role of physical activity in skeletal development: how exercise may counter low calcium intake. *Am J Clin Nutr* 2000 Jun;71(6):1384-6.
- (74) Snyder A, Zierath JR, Hawley JA, Sleeper MD, Craig BW. The effects of exercise mode, swimming vs. running, upon bone growth in the rapidly growing female rat. *Mech Ageing Dev* 1992;66(1):59-69.
- (75) Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 2003 Jul;95(1):300-7.
- (76) Hoshi A, Watanabe H, Chiba M, Inaba Y. Bone density and mechanical properties in femoral bone of swim loaded aged mice. *Biomed Environ Sci* 1998 Sep;11(3):243-50.
- (77) Bravo G, Gauthier P, Roy PM, Payette H, Gaulin P. A weight-bearing, water-based exercise program for osteopenic women: its impact on bone, functional fitness, and well-being. *Arch Phys Med Rehabil* 1997 Dec;78(12):1375-80.
- (78) Melton SA, Hegsted M, Keenan MJ, Morris GS, O'Neil CE, Zablah-Pimentel EM. Water exercise prevents femur density loss associated with ovariectomy in the retired breeder rat. *J Strength Cond Res* 2004 Aug;18(3):508-12.

-
- (79) Mathey J, Horcajada-Molteni MN, Chanteranne B, Picherit C, Puel C, Lebecque P, et al. Bone mass in obese diabetic Zucker rats: influence of treadmill running. *Calcif Tissue Int* 2002 Apr;70(4):305-11.
- (80) Tuukkanen J, Peng Z, Vaananen HK. Effect of running exercise on the bone loss induced by orchidectomy in the rat. *Calcif Tissue Int* 1994 Jul;55(1):33-7.
- (81) Simkin A, Leichter I, Swissa A, Samueloff S. The effect of swimming activity on bone architecture in growing rats. *J Biomech* 1989;22(8-9):845-51.
- (82) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. National Research Council 2010
- (83) Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 2002 Apr;92(4):1367-77.
- (84) Ueno N, Oh-ishi S, Kizaki T, Nishida M, Ohno H. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP m-RNA expression. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997 Jan;95(1):92-104.
- (85) Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. 2a ed. São Paulo: EPU; 1981.
- (86) Triola MF. Introdução à Estatística. 10a ed. Rio de Janeiro: LCT; 2008.
- (87) Vieira S. Análise de Variância: Anova. São Paulo: Atlas; 2012.
- (88) Hefferan TE, Evans GL, Lotinun S, Zhang M, Morey-Holton E, Turner RT. Effect of gender on bone turnover in adult rats during simulated weightlessness. *J Appl Physiol* 2003 Nov;95(5):1775-80.
- (89) Norman TL, Bradley-Popovich G, Clovis N, Cutlip RG, Bryner RW. Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. *Aviat Space Environ Med* 2000 Jun;71(6):593-8.
- (90) Vico L, Lafage-Proust MH, Alexandre C. Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo. *Bone* 1998 May;22(5 Suppl):95S-100S.
- (91) Sun LW, Fan YB, Li DY, Zhao F, Xie T, Yang X, et al. Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation. *Acta Biomater* 2009 Nov;5(9):3506-11.
- (92) Smith EL, Raab DM. Osteoporosis and physical activity. *Acta Med Scand Suppl* 1986;711:149-56.
- (93) Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, et al. Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* 1994 Jun 23;330(25):1769-75.

-
- (94) Bailey CA, Brooke-Wavell K. Exercise for optimising peak bone mass in women. *Proc Nutr Soc* 2008 Feb;67(1):9-18.
 - (95) Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, Kurono M, Mashiko S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res* 1997 Sep;12(9):1480-5.
 - (96) Pichler K, Loreto C, Leonardi R, Reuber T, Weinberg AM, Musumeci G. RANKL is downregulated in bone cells by physical activity (treadmill and vibration stimulation training) in rat with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Histol Histopathol* 2013 Sep;28(9):1185-96.
 - (97) Cardinale M, Rittweger J. Vibration exercise makes your muscles and bones stronger: fact or fiction? *J Br Menopause Soc* 2006 Mar;12(1):12-8.
 - (98) Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, Schmelz U, Kolios L, Rack T, et al. Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rat as an osteopenia model. *Calcif Tissue Int* 2011 Jan;88(1):33-40.
 - (99) Kim CS, Nakajima D, Yang CY, Oh TW, Igawa S, Miyazaki M, et al. Prolonged swimming exercise training induce hypophosphatemic osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2000 Nov;19(6):271-7.
 - (100) Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1988 Nov;65(5):2318-25.
 - (101) Lecoq B, Potrel-Burgot C, Granier P, Sabatier JP, Marcelli C. Comparison of bone loss induced in female rats by hindlimb unloading, ovariectomy, or both. *Joint Bone Spine* 2006 Mar;73(2):189-95.
 - (102) Bloomfield SA, Allen MR, Hogan HA, Delp MD. Site- and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. *Bone* 2002 Jul;31(1):149-57.
 - (103) Busse B, Hahn M, Soltan M, Zustin J, Puschel K, Duda GN, et al. Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. *Bone* 2009 Dec;45(6):1034-43.
 - (104) Allen MR, Bloomfield SA. Hindlimb unloading has a greater effect on cortical compared with cancellous bone in mature female rats. *J Appl Physiol* 2003 Feb;94(2):642-50.
 - (105) Cole JH, van der Meulen MC. Whole bone mechanics and bone quality. *Clin Orthop Relat Res* 2011 Aug;469(8):2139-49.
 - (106) Bogdanis GC. Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. *Front Physiol* 2012;3:142.

-
- (107) Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Gagliano H, Fuentes S, Bayod S, Camins A, et al. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* 2012 Nov;37(11):1745-54.
 - (108) Greenway KG, Walkley JW, Rich PA. Does long-term swimming participation have a deleterious effect on the adult female skeleton? *Eur J Appl Physiol* 2012 Sep;112(9):3217-25.
 - (109) Vilaça K, Ferriolli E, Lima N, De Paula F, Marchini J, Morigutti J. Força muscular e densidade mineral óssea em idosos eutróficos e desnutridos. *Rev Nutr* 2011;24(6).
 - (110) Klein-Nulend J, van der PA, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, et al. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 1995 Mar;9(5):441-5.
 - (111) Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, et al. Loading and skeletal development and maintenance. *J Osteoporos* 2010;2011:786752.
 - (112) Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci* 2007;12:1450-62.

ANEXOS

ANEXO A – Cópia do protocolo de aprovação do trabalho pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 141/2010, sobre o projeto intitulado “*Análise das propriedades mecânicas dos ossos de ratos submetidos a um modelo de suspensão pela cauda e tratados com exercícios de natação*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Batista Volpon** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de julho de 2011.

(We certify that the protocol nº 141/2010, about “*Analysis of mechanical properties on rats bones subjected to a suspension model by the tail and treated with swimming exercise*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 07/25/2011.

Ribeirão Preto, 25 de julho de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas

*Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal*