UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCOS MASSAO SHIMANO

Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercício

Ribeirão Preto
2006

MARCOS MASSAO SHIMANO

**Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e
trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e
exercitação**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Ortopedia,
Traumatologia e Reabilitação
Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

Ribeirão Preto
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Shimano, Marcos Massao

Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercitação. Ribeirão Preto, 2006.

154 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Rato. 2. Suspensão pela cauda. 3. Treinamento em esteira. 4. Propriedades mecânicas. 5. Corpo de prova de osso cortical. 6. Terço proximal de fêmur. 7. Tetraciclina.

DEDICATÓRIA

Dedico a meu filho João Pedro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me fazer capaz de realizar meus sonhos...

Faço um agradecimento especial ao principal responsável pela minha formação, Prof. Dr. José B. Volpon. Muito obrigado professor pelos ensinamentos, orientações e, principalmente pelo exemplo de dedicação, sabedoria, seriedade e profissionalismo.

Agradeço,

A meu irmão Prof. Dr. Antônio C. Shimano, que nunca mediu esforço para me ajudar e sempre fez parte dos momentos mais importantes da minha vida. Muito Obrigado meu irmão!

À minha esposa Suraya, que além das alegrias e felicidades, também ajudou muito durante todos os processos deste trabalho e sempre acreditou na minha capacidade.

A meu grande amigo e incentivador Luis Carlos (em memória).

Aos funcionários (meus amigos) do Laboratório de Bioengenharia de Ribeirão Preto, Francisco (Chico), Luiz Henrique, Moro, Maria Teresinha e mais recentemente Reginaldo, pelos auxílios prestados durante a realização deste trabalho e pela agradável convivência.

Às secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Maria de Fátima Feitosa de Lima e Elisângela Bernardi de Oliveira pelo atendimento e informações prestados a mim.

Aos funcionários da Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto pelas confecções das peças e acessórios.

À Profa. Dra. Débora B. Grossi pela orientação no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE).

Ao Dr. Fábio Vinícius Teche pela realização das radiografias em seu consultório.

Ao Prof. Dr. Plauto C. A. Watanabe pela utilização da câmara escura do departamento MEF da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP.

A todos os meus familiares que me deram apoio e incentivo.

Aos meus amigos Vitor Castania, Francisco, João Paulo, Juliana e Emilson, pelas grandes contribuições dadas durante a realização desta tese.

E a todas às pessoas que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Com dedicação e quando se têm à sua volta pessoas de “bom coração” tudo dá certo.

Muito Obrigado a todos!

Agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro nesta pesquisa (processo FAPESP: 2003/13022-0).

E agradeço à CAPES, Comissão de Auxílio à Pesquisa do Ensino Superior, pelo apoio e concessão de bolsa de doutorado.

RESUMO

SHIMANO, M.M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercitação.** 2006. 154f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A remodelação óssea pode ser estimulada por forças mecânicas presentes nas atividades físicas normais. Mas, a diminuição dos estímulos mecânicos, observada em vôos espaciais (exposição dos astronautas ao ambiente de microgravidade), nas imobilizações ortopédicas e na permanência prolongada de pacientes no leito, pode causar danos significativos na estrutura óssea. Neste caso, aumenta o risco de fraturas, não durante o período de sub-carregamento, mas no retorno às atividades físicas normais. A contra medida mais estudada para evitar danos ou promover a recuperação da estrutura óssea, é o exercício físico. Portanto, um dos objetivos desta pesquisa surgiu do interesse em analisar mecanicamente e microscopicamente fêmures de ratos submetidos à hipocinesia e posterior treinamento em esteira. Outro objetivo surgiu da necessidade de desenvolver metodologias mais precisas de análises mecânicas em ossos longos de ratos. Foram utilizadas 66 ratas da raça Wistar. Os animais foram criados até a idade de 90 dias, para o início dos procedimentos experimentais. Eles foram divididos em cinco grupos, sendo dois controles e três experimentais. Os animais do grupo Cont I foram criados até completarem 118 dias de idade e serviu de controle para o grupo S (suspensão), que consistiu em suspender os animais pela cauda por 28 dias. Já no grupo Cont II os animais foram criados até 139 dias e foi o controle para os grupos S-L (suspensão e liberado) e S-T (suspensão e treinado). No grupo S-L os animais foram liberados por 21 dias, após o período de suspensão pela cauda. No grupo S-T os animais passaram por um protocolo de treinamento em esteira por 21 dias após a suspensão pela cauda. Foram analisadas algumas propriedades mecânicas do terço proximal do fêmur esquerdo e da diáfise do fêmur direito. Outra análise realizada foi a microscópica, por meio de fluorescência óssea da região do terço proximal do fêmur direito e da região da diáfise do fêmur esquerdo. A suspensão pela cauda provocou diminuição das propriedades mecânicas do terço proximal do fêmur dos animais, apesar de não apresentar diferença visível na análise microscópica. A liberação após a suspensão causou alterações no núcleo de ossificação, na esfericidade da cabeça e na placa de crescimento do terço proximal do fêmur, sem alterar o comportamento mecânico desta região. E o treinamento conservou o núcleo de ossificação e a esfericidade da cabeça após a suspensão, e também, não alterou o comportamento mecânico. A ossificação periosteal na diáfise do fêmur dos animais suspensos diminuiu, no grupo S-L foi mais acentuada no endóstio e, no grupo S-T o treinamento promoveu a recuperação do balanço osteogênico. A liberação promoveu a recuperação parcial do comportamento mecânico do osso cortical da diáfise do fêmur do rato e, o treinamento recuperou as propriedades e estimulou a formação de osso novo.

Palavras chaves: Rato. Suspensão pela cauda. Treinamento em esteira. Propriedades mecânicas. Corpo de prova de osso cortical. Terço proximal de fêmur. Tetraciclina.

ABSTRACT

SHIMANO, M.M. **Microstructure and mechanical properties of the cortical and trabecular bone rats, after tail suspension and exercitation.** 2006. 154f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Bone remodeling can be stimulated by the mechanical solicitation from normal physical activities. Consequently, decreasing of mechanical stimuli as occurring during spatial flights, prolonged bed rest and orthopedic immobilization may cause significant weakening of the bone structure. In such cases there is an increased risk of fractures when the normal physical activities are resumed. Physical exercises are a way to try to strengthen the bone structure. Therefore, in the present research we investigated the mechanical behavior and microscopy analysis of long bones from rats that were previously maintained in tail suspension and later, submitted to physical exercise in a treadmill. An additional aim came up from the necessity to develop more precise technologies that mechanical testing in long bones of rats. Sixty-six Wistar rats were used. Firstly, the animals were raised until the age of ninety days and the divided into five groups (two controls and three experimental). The animals allocated to control I were killed at 118 days of age. In the groups S, the animals were tail suspended during 28 days. In the control group II the animals were killed at 139 days of age. In group S-R (suspended and released) the rats were keep free for 21 days after the tail suspension. In group S-T (suspended and trained) after the tail suspension period the rats were trained in treadmill during 21 days. The mechanical properties of the whole proximal third of the femur were analyzed in flexion-compression on one side and from the opposite side femur bone samples were harnested for three-point bending tests. Furthermore, the osteogeneses in different groups were studied at the mid-diaphysis of the femur and at the proximal femoral epiphysis with oxitetracycline. The suspension caused a decrease of the mechanical properties of the proximal femur. Resuming free activities in cage after the suspension period caused flattening of the femoral head and earlier closure of the growth plate, but no difference of the mechanical behavior was detected. Conversely, the treadmill training caused no alteration in the femoral head shape, but the mechanical properties did not change. The fluorescence studies showed that there was a decrease of the osteogenic activity at the subperiosteal level in suspended animals, but for suspended-released rats the diminished activity occurred at the endosteal level. The treadmill training caused recovering of the osteogenic balance. The post-suspension released in cage promoted partial recovery of the mechanical properties of the diaphyseal bone and the treadmill training besides recovering the normal mechanical properties did stimulate the new-bone formation.

Key words: Rat. Tail suspension. Treadmill training. Mechanical properties. Specimens cortical bone. Femoral proximal epiphysis. Tetracycline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático do corte de um osso longo (fêmur) mostrando a epífise (osso trabecular) e a diáfise (osso cortical).	23
Figura 2 – Modelo de suspensão pela cauda. O animal realiza apoio com os membros anteriores e os membros posteriores ficam elevados, sem apoio (KASPER et al., 1993).	28
Figura 3 – Desenho teórico representativo das regiões de deformação elástica e plástica observadas em uma curva teórica tensão x deformação.....	32
Figura 4 – Desenho esquemático dos procedimentos de preparação do animal para a suspensão pela cauda. (A) Cauda do animal. (B) Posicionamento de duas espumas adesivas (Reston®). (C) Aplicação da bandagem elástica (Coban® - modelo 1582 da marca 3M®) envolvendo toda a espuma e a colocação de um cordão estreito para formar uma alça. (D) Amputação da extremidade não enfaixada, para evitar necrose.	43
Figura 5 – Gaiola para suspensão dos animais. (A) Gaiola de metal. (B) Caixa de acrílico transparente. (C) Conjunto montado.	44
Figura 6 – Desenho esquemático do sistema de fixação do animal na gaiola para suspensão.....	45
Figura 7 – Desenho esquemático do rato suspenso pela cauda.....	46
Figura 8 – Esteira motorizada para ratos da marca Insight® - modelo EP-131.	47
Figura 9 – Esquema dos dias e periodização do treinamento.....	48
Figura 10 – Desenho esquemático do ensaio realizado no fêmur esquerdo (A) Força vertical aplicada na cabeça do fêmur. (B) Diagrama de forças na extremidade proximal do fêmur durante o ensaio de compressão.....	51
Figura 11 – Desenho esquemático do acessório confeccionado para a inclusão da porção distal dos fêmures dos ratos em acrílico. (A) Acessório desmontado. (B) Primeira montagem para colagem e alinhamento dos fêmures. (C) Acessório montado.	52
Figura 12 – Ilustração dos principais passos para o posicionamento dos fêmures no acessório para a inclusão em resina acrílica. (A) Colagem e	

posicionamento dos fêmures no acessório. (B) Fêmures colados na base do acessório. (C) Acessório fechado e pronto para receber a resina.	54
Figura 13 – Acessório contendo os fêmures e preenchido com resina.	55
Figura 14 – Acessório aberto para retirada do conjunto acrílico-osso.....	55
Figura 15 – Conjunto acrílico-osso pronto para o ensaio.	56
Figura 16 – Detalhe da realização do ensaio com aplicação da força na cabeça femoral.	56
Figura 17 – Desenho esquemático do gráfico força x deformação obtido do ensaio mecânico na cabeça do fêmur esquerdo de ratas.	57
Figura 18 – Equipamento de radiografia odontológica. Marca Dabi Atlante® – modelo Spectro 70x – classe I tipo B comum.	58
Figura 19 – Detalhes do posicionamento do conjunto acrílico-osso sobre o filme radiográfico e sob o foco do equipamento de radiografia.	59
Figura 20 – Radiografia. (A) Conjunto acrílico-osso. (B) Ampliação do terço proximal do fêmur após ensaio, ilustrando a fratura (seta).	59
Figura 21 – Esquema do local da obtenção do corpo de prova (face anterior da diáfise do fêmur de ratos).	60
Figura 22 – Marcação dos fêmures para identificação dos locais para os cortes. (A) Medida do comprimento total para fazer a marcação. (B) Marcações centrais.	61
Figura 23 – Corte para retirar o segmento proximal do fêmur.....	61
Figura 24 – Realização dos cortes paralelos. (A) Cortadeira metalográfica. (B) Desenho esquemático do sistema para realização dos cortes. (C) Posicionamento do osso sobre os dois discos distanciados de 1,4mm. (D) Corte sendo realizado. (E) e (F) Final do corte até a marcação mais distal.....	63
Figura 25 – Detalhes dos cortes para obtenção do corpo de prova de fêmures de ratos. (A) Detalhe dos cortes paralelos. (B) Corpo de prova obtido.....	64
Figura 26 – Desenho do acessório confeccionado para realização dos ensaios de flexão em três pontos em corpos de provas de fêmures de ratos.....	65
Figura 27 – Posicionamento do corpo de prova no acessório para ensaio de flexão em três pontos.	66
Figura 28 – Diagrama das forças e do momento fletor M ao longo de uma amostra submetida a flexão em três pontos.	67

Figura 29 – Desenho esquemático da obtenção do limite de proporcionalidade. (A) Determinação da equação da reta na fase elástica. (B) Limite de proporcionalidade exatamente no ponto onde a curva e a nova reta se cruzam.	69
Figura 30 – Obtenção da equação da reta entre as tensões de 50MPa e 120MPa, a partir da criação da linha de tendência linear em um dos gráficos obtidos do ensaio de flexão de três pontos no corpo de prova de osso cortical obtido do fêmur de rato.....	70
Figura 31 – Gráfico apresentando a curva e a reta deslocada 0,2% para determinação do limite de proporcionalidade.....	71
Figura 32 – Desenho esquemático das secções retiradas da parte proximal do fêmur direito para análise microscópica.....	73
Figura 33 – (A) Molde confeccionado para inclusão em acrílico dos fragmentos ósseos. (B) Detalhe do posicionamento do fragmento ósseo dentro dos compartimentos do molde.....	74
Figura 34 – Câmara de vácuo utilizada para retirar as bolhas de ar da resina.	75
Figura 35 – Bloco de resina acrílica contendo o terço proximal do fêmur incluído....	76
Figura 36 – Detalhes da realização do corte para montagem da lâmina.	76
Figura 37 – Desenho esquemático das secções transversais retiradas da região médio-diafisária do fêmur esquerdo para análise microscópica.	78
Figura 38 – Desenho esquemático do fragmento retirado do meio da diáfise do fêmur esquerdo para obtenção de secções transversais para a análise microscópica.	78
Figura 39 – Gráficos dos ensaios de compressão realizados no terço proximal dos fêmures dos grupos S-L e S-T. Destaque para as curvas que foram desprezadas por apresentarem comportamento muito diferente do comportamento das outras curvas.....	82
Figura 40 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo Cont I (controle I).	85
Figura 41 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo S (suspensão).....	86
Figura 42 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo Cont II (controle II).	86

Figura 43 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo S-L (suspensão-liberado).....	87
Figura 44 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo S-T (suspensão-treinado).	87
Figura 45 – Valores médios da rigidez obtidos dos ensaios de flexo-compressão realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais, nos vários grupos.	89
Figura 46 – Valores médios da força máxima obtidos dos ensaios de flexo-compressão realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais, nos vários grupos.	90
Figura 47 – Detalhes de algumas radiografias obtidas após o ensaio de flexo-compressão no terço proximal dos fêmures esquerdos de diferentes grupos, mostrando as fraturas (Setas).....	91
Figura 48 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo Cont I (controle I).....	92
Figura 49 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo S (suspensão).	93
Figura 50 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo Cont II (controle II).....	93
Figura 51 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo S-L (suspensão-liberado).	94
Figura 52 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo S-T (suspensão-treinado).....	94
Figura 53 – Comparação entre os valores médios da tensão no limite de proporcionalidade dos CDP de osso cortical obtidos do fêmur direito, nos vários grupos.	96
Figura 54 – Comparação entre os valores médios da deflexão no limite de proporcionalidade dos CDP de osso cortical obtidos do fêmur direito, nos diferentes grupos.	97
Figura 55 – Valores médios do módulo de elasticidade obtidos dos ensaios de flexão realizados nos corpos de prova do fêmur direito dos animais, nos diferentes grupos.	98

Figura 56 – Valores médios da tensão máxima obtidos dos ensaios de flexão realizados nos corpos de prova do fêmur direito dos animais, nos diferentes grupos.	99
Figura 57 – Valores médios do módulo de tenacidade obtidos dos ensaios de flexão realizados nos corpos de prova do fêmur direito dos animais, nos diferentes grupos.	100
Figura 58 – Corte transversal da diáfise do fêmur de um animal do grupo Controle I. Detalhe para a neoformação óssea periosteal e endosteal, caracterizada pelos anéis fluorescentes. (barra = 1mm).	102
Figura 59 – Sistema vascular intra-ósseo (canais de Volkmann) no interior da córtex do fêmur de um animal do grupo Controle II. (barra = 1mm).	102
Figura 60 – Lamelas ósseas distribuídas em três camadas. Na mais externa (1), as lamelas apresentavam disposição paralela à superfície cortical, na camada intermediária (2) as lamelas estavam dispostas irregularmente ou ao redor dos canais de Havers (setas) e na camada mais interna (3), as lamelas também apresentavam disposição paralela à semelhança da primeira camada. (barra = 1mm).	103
Figura 61 – Cabeça femoral observada por meio de fluorescência de um animal do grupo Controle I. A placa de crescimento foi visível (setas) e o núcleo de ossificação apresentou trabeculado tipo esponjoso (*). (barra = 1mm)	104
Figura 62 – Osso subcondral (*) e cartilagem (seta) da cabeça femoral dos animais dos grupos controles. (barra = 1mm).	105
Figura 63 – Placa de crescimento com uma faixa de fluorescência adjacente com disposição paralela do trabeculado na cabeça femoral dos animais dos grupos controles. (barra = 1mm).	105
Figura 64 – Corte transversal da diáfise do fêmur de um animal do grupo S (suspensão). Detalhe para a menor fluorescência na superfície externa. (barra = 1mm).	106
Figura 65 – Corte transversal da diáfise femoral de um animal do grupo S-L (suspensão-liberado). Detalhe para as irregularidades da lâmina fluorescente subperiosteal e para o aumento da lâmina fluorescente endosteal. (barras = 1mm).	107

Figura 66 – Corte no plano frontal da região proximal do fêmur de um animal do grupo S-L (suspensão-liberado). Detalhes para a perda da esfericidade e diminuição do tamanho do núcleo de ossificação. (Barra = 1mm).....	108
Figura 67 – Irregularidades da placa de crescimento da cabeça femoral dos animais do grupo S-L (suspensão-liberado). Alargamento (*) e descontinuidade (círculo). (barra = 1mm).	109
Figura 68 – Desorganização do osso subcondral (*) da cabeça femoral dos animais do grupo S-L (suspensão-liberado). (barra = 1mm).....	109
Figura 69 – Corte no plano frontal da região proximal do fêmur de um animal do grupo S-T (suspensão-treinado). Detalhe para a preservação da esfericidade e do trabeculado no núcleo de ossificação. Outro detalhe é a interrupção da placa de crescimento na região lateral (seta). (barra = 1mm).....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios das massas corporais após cada procedimento experimental e dos fêmures.....	84
Tabela 2 – Valores médios da rigidez e da força máxima obtidos dos ensaios realizados no terço proximal do fêmur esquerdo das ratas.....	88
Tabela 3 – Comparações estatísticas da rigidez entre os grupos.	89
Tabela 4 – Comparações estatísticas da força máxima entre os grupos.	90
Tabela 5 – Valores médios das propriedades mecânicas obtidos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos das ratas.	95
Tabela 6 – Comparações estatísticas da tensão no limite de proporcionalidade entre os grupos.	96
Tabela 7 – Comparações estatísticas da deflexão no limite de proporcionalidade entre os grupos.	97
Tabela 8 – Comparações estatísticas do módulo de elasticidade entre os grupos. ...	98
Tabela 9 – Comparações estatísticas da tensão máxima entre os grupos.	99
Tabela 10 – Comparações estatísticas do módulo de tenacidade entre os grupos.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMO	- Densidade Mineral Óssea
CMO	- Conteúdo Mineral Ósseo
NASA	- <i>National Aeronautics and Space Administration</i>
CETEA	- Comissão de Ética em Experimentação Animal
USP	- Universidade de São Paulo
M	- Momento fletor
FM	- Força máxima
d	- Distância entre o ponto de aplicação da força e a linha neutra
F	- Força
c	- Distância da linha neutra até o ponto de aplicação da força
I	- Momento de inércia inicial da secção transversal
L	- Distância entre os apoios
h	- Altura do corpo de prova
b	- Largura do corpo de prova
CDP	- Corpo de prova
y	- Variável que representa as tensões
A e B	- Constantes
x	- Variável que representa as deflexões
x'	- Variável que representa novas deflexões na reta deslocada 0,2%
n	- Valor utilizado para substituir o limite de escoamento
k	- Deflexão (flecha)
Desv. Pad.	- Desvio padrão
U_T	- Módulo de Tenacidade

LISTA DE SÍMBOLOS

m/min	- metros por minuto
cm	- centímetro
mg/kg	- miligramas por kilograma
°C	- graus Celsius
mm	- milímetro
m	- metro
g	- grama
N	- Newton
s	- segundo
ml	- mililitro
kg	- kilograma
min	- minuto
kVp	- kiloVolt
mA	- miliÂmpere
mm/min	- milímetros por minuto
rpm	- rotações por minuto
dpi	- <i>dots per inch</i> (pontos por polegadas)
σ	- Tensão
MPa	- Mega Pascal
GPa	- Giga Pascal
MPa.m	- Mega Pascal vezes metro
N/m	- Newton por metro
N.m	- Newton vezes metro
μm	- Micrometro

SUMÁRIO¹

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Osso	20
1.1.1	Classificação	22
1.1.2	Remodelação óssea	23
1.2	Efeitos do “sub-carregamento do peso” corporal sobre a estrutura óssea.....	24
1.2.1	Simulação em animais	26
1.3	Treinamento	29
1.4	Comportamento mecânico dos ossos	31
1.5	Marcação óssea por tetraciclina.....	36
1.6	Objetivos.....	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Animais	40
2.2	Grupos experimentais	41
2.3	Técnica de suspensão.....	42
2.3.1	Preparo do animal.....	42
2.3.2	Sistema de suspensão.....	43
2.4	Treinamento	47
2.5	Análise mecânica	49
2.5.1	Fêmur esquerdo (terço proximal)	51
2.5.2	Fêmur direito (osso cortical da diáfise anterior)	60
2.6	Análise microscópica	73
2.6.1	Terço proximal do fêmur	73
2.6.2	Diáfise femoral	78
2.6.3	Análise	79
2.7	Análise estatística.....	80
3	RESULTADOS.....	82
3.1	Massa	83
3.2	Propriedades mecânicas do terço proximal do fêmur esquerdo.....	85

¹ Normas de acordo com as **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso** – São Paulo – 2004.

3.2.1	<i>Rigidez</i>	89
3.2.2	<i>Força máxima</i>	90
3.2.3	<i>Resultados radiográficos</i>	91
3.3	Propriedades mecânicas dos corpos de prova do fêmur direito	92
3.3.1	<i>Limite de proporcionalidade</i>	96
3.3.2	<i>Módulo de elasticidade</i>	98
3.3.3	<i>Tensão máxima</i>	99
3.3.4	<i>Módulo de tenacidade</i>	100
3.4	Análise microscópica	101
3.4.1	<i>Grupos Cont I e Cont II (controles)</i>	101
3.4.2	<i>Grupo S (suspensão)</i>	106
3.4.3	<i>Grupo S-L (suspensão e liberado)</i>	107
3.4.4	<i>Grupo S-T (suspensão e treinado)</i>	110
4	DISCUSSÃO	112
4.1	Análises mecânicas	115
4.1.1	<i>Terço proximal dos fêmures</i>	116
4.1.2	<i>Osso cortical da diáfise anterior dos fêmures</i>	119
4.2	Análise microscópica	123
4.3	Considerações finais	126
5	CONCLUSÕES	130
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
	ANEXOS	141

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Segundo Bikle, Sakata e Halloran (2003), a osteogênese pode ser estimulada por pequenas deformações na arquitetura óssea, provocadas por forças mecânicas aplicadas durante uma atividade física normal. A atividade física pode atuar diretamente na taxa de remodelamento ósseo. Já, a hipocinesia (diminuição das atividades) leva a um processo de diminuição dessa taxa (TURNER, 1999). Portanto, um ambiente ou situação com menor quantidade de estímulos mecânicos produz efeitos diretos na estrutura óssea. Exemplos desta situação são observados em viagens espaciais (exposição de astronautas ao ambiente de microgravidade), nas imobilizações ortopédicas e na permanência prolongada de pacientes no leito que, segundo Holick (1998), podem causar perdas significativas da densidade mineral óssea e da massa óssea.

Nestes casos, o esqueleto reconhece que não precisa de toda sua massa óssea para manter sua integridade estrutural, e desenvolve a osteopenia, que poderá levar a fraturas ósseas, logo após o retorno às atividades físicas (MOREY-HOLTON; GLOBUS, 1998).

Na engenharia, o estudo do comportamento mecânico de materiais é muito utilizado e bem definido. A utilização deste estudo aplicado aos materiais biológicos é relativamente nova. Portanto, são importantes as realizações de trabalhos com objetivos de desenvolverem metodologias mais precisas de análises mecânicas em materiais biológicos.

1.1 Osso

O tecido ósseo inicia sua formação na sétima semana embrionária (TUREK, 1991) e continua desenvolvendo-se, remodelando e desempenhando funções estruturais e metabólicas.

As funções estruturais dos ossos incluem o suporte para o corpo, a proteção dos órgãos internos vitais e, mediante a ação muscular, funcionam como alavancas rígidas para realização dos movimentos. Como funções metabólicas, estão as capacidades de servirem como depósito e promover a reciclagem do cálcio e outros sais, necessários para a condução nervosa, contração muscular, coagulação sanguínea e fisiologia celular.

Os ossos são compostos por células e matriz extracelular. As células ósseas incluem os osteoblastos (células formadoras de osso), osteoclastos (células destruidoras de osso) e osteócitos (células mantenedoras de osso). A matriz extracelular é composta por duas fases, uma orgânica composta de colágeno e glicosaminoglicanas e uma inorgânica composta basicamente por cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita).

Os osteoblastos revestem a superfície do osso em crescimento ativo, e são células que sintetizam e secretam a substância intercelular orgânica. Algumas destas células ficam aprisionadas em lacunas e diferenciam-se em osteócitos, que permanecem incluídos dentro da nova substância intercelular. Os osteoblastos acrescentam sucessivas camadas novas na superfície óssea por meio de um processo denominado crescimento aposicional.

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas com variações no tamanho e no número de núcleos e atuam para reabsorver tanto minerais quanto substâncias orgânicas intercelular.

A substância intercelular do osso é atravessada por um sistema de canais, que se comunicam com os prolongamentos citoplasmáticos dos osteoblastos. Por meio desta rede de canais é feita a comunicação entre as células ósseas. Os canalículos expandem de cada lacuna e se reúnem com os de outras lacunas que estão próximas à superfície óssea adjacente aos vasos nutrientes (canais de Havers), formando uma rede canalicular e proporcionando o meio para que os nutrientes dos vasos sanguíneos possam chegar até os osteócitos e os produtos celulares saírem.

Os canalículos comunicam-se com o vaso sanguíneo do interior de cada sistema haversiano, fornecendo os líquidos tissulares destinados à nutrição dos osteócitos que estão situados nas lâminas concêntricas dos sistemas haversianos.

A fase orgânica é produzida e secretada pelos osteoblastos. Compreende aproximadamente 50% do volume ósseo (25% do peso) e contém 90% de colágeno e 10% de substâncias amorfas (glicoproteínas e glicosaminoglicanas). A fase inorgânica constitui aproximadamente 50% do volume ósseo (75% do peso) e é composta por cristais de cálcio em forma de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Estes cristais de hidroxiapatita são precipitados ordenadamente ao redor das fibras de colágeno presentes nos osteóides. O osteóide é a substância intercelular orgânica produzida pelos osteoblastos que poderá ser calcificada posteriormente. Eles são 70% calcificados após poucos dias, chegando à máxima calcificação somente após vários meses (BOUVIER, 1989).

1.1.1 Classificação

O osso pode ser classificado em trabecular (esponjoso) e cortical (compacto). Estes dois tipos de ossos são formados pelos mesmos tipos de células e de substâncias intercelular, mas diferem entre si quanto à disposição espacial (RHO; KUHR-SPEARING; ZIOUPOS, 1998).

O osso trabecular é formado por trabéculas entrecruzadas de diversas formas e espessuras e os espaços entre elas são cheios de medula óssea. A maioria das trabéculas ósseas é interligada e distribuída ao longo das linhas de tensões mecânicas (Figura 1).

O osso cortical é uma massa óssea contínua e, comparado ao osso trabecular, pode ser considerado compacto. A unidade estrutural básica deste osso é denominada sistema haversiano ou ósteon. Ele consiste de lâminas concêntricas distribuídas ao redor do canal de Havers. O osso compacto é composto de grande número de sistemas haversianos, entre os quais existem lâminas intersticiais que são remanescentes de sistemas haversianos que não foram totalmente reabsorvidos. A maior parte destes sistemas é dirigida no eixo longitudinal do osso (TUREK, 1991) (Figura 1).

Figura 1 – Desenho esquemático do corte de um osso longo (fêmur) mostrando a epífise (osso trabecular) e a diáfise (osso cortical).

1.1.2 Remodelação óssea

Durante toda a vida, os ossos passam por um constante processo de remodelação, que ocorre por fatores que determinam a liberação de cálcio ósseo, ao mesmo tempo em que a deposição de osso deve continuar a fim de manter o balanço ósseo.

Quando consideramos os efeitos da variação das tensões no remodelamento ósseo, podemos dizer que há uma resposta adaptativa das células ósseas às

mudanças no carregamento. Esta resposta resulta no depósito de uma nova matriz óssea e/ou reabsorção do osso existente para manter a eficiência e a segurança para suportar as cargas as quais o osso é exposto.

De acordo com Meade (1989) as alterações físicas impostas ao osso podem ser consideradas como a soma de três fontes de tensões. A primeira é a tensão gerada pelo tônus muscular que está relacionada com a massa muscular pois está presente mesmo quando o animal não precisa suportar o seu peso. A segunda é relativamente constante e está associada ao suporte do peso do animal quando está parado. A terceira é cíclica e ocorre durante a deambulação que varia com a natureza da marcha (caminhada ou corrida) e a velocidade. A intensidade da atuação de cada fonte de tensões pode variar de acordo com o tipo de atividade física ou de hipocinesia (diminuição de atividade).

1.2 Efeitos do “sub-carregamento do peso”² corporal sobre a estrutura óssea

Do começo ao fim da vida, o sistema esquelético ajusta-se para manter a integridade estrutural dos ossos que, no cotidiano, estão sujeitos a várias condições de carregamento mecânico. Conseqüentemente, a resposta estrutural, em parte, deve-se ao passado histórico de cargas impostas sobre o esqueleto e à necessidade presente (KELLER; SPENGLER; CARTER, 1986).

² A expressão “sub-carregamento do peso” foi usada neste trabalho para substituir a palavra *Weightlessness* em inglês, que não possui tradução para o português. Esta palavra foi utilizada com o significado de diminuição da carga imposta pelo peso corporal sobre a estrutura esquelética.

Estudos dos efeitos do sub-carregamento do peso sobre o metabolismo do cálcio mostraram que o aumento na excreção urinária desse íon não é devido à inatividade em si, mas sim à ausência de compressão longitudinal sobre os ossos longos. Se a excreção urinária de cálcio puder ser entendida como uma indicação de desmineralização óssea, parece que a força gravitacional sobre os ossos longos é essencial para o trofismo ósseo (ASTRAND; RODAHL, 1980).

As perdas da densidade mineral óssea (DMO) durante vôos espaciais podem ser comparadas às perdas atribuídas ao envelhecimento. A taxa média da perda da DMO no terço proximal do fêmur e nas vértebras lombares nos homens e nas mulheres acima de 55 anos de idade foi estimada em aproximadamente 0,5% a 1% por ano (ENSRUD et al., 1995; GREENSPAN; MAITLAND-RAMSEY; MYERS, 1996). Estas perdas aumentam o risco de fraturas no quadril de indivíduos idosos na taxa aproximada de 4% por ano e, após a idade de 75 anos, o risco pode aumentar exponencialmente (BURGER et al., 1998).

Segundo Schaffner (2006), durante vôos espaciais, a perda da DMO no terço proximal do fêmur e nas vértebras lombares a perda é de aproximadamente 1% a 2% por mês, dez vezes ou mais do que a perda que ocorre no envelhecimento normal. Ou seja, uma perda estimada de 20% da DMO no colo femoral durante um ano no espaço corresponderia à perda média da DMO no colo femoral do envelhecimento de uma mulher de 50 anos até aproximadamente os 80 anos (LOOKER et al., 1995). Os mecanismos responsáveis pela perda óssea no envelhecimento e no vôo espacial são, provavelmente, diferentes (LeBLANC; SCHNEIDER, 1991) mas, as similaridades nas mudanças podem ser benéficas nos estudos de ambos os casos (HUGHES-FULFORD, 1991).

Em um estudo mais recente sobre a perda de DMO em astronautas durante vôos espaciais (CAVANAGH; LICATA; RICE, 2005), os autores encontraram perdas aproximadas de 0,9% por mês nas vértebras e de 1,5% por mês no fêmur.

O sub-carregamento do peso também é observado em pessoas que permanecem em repouso prolongado no leito. Estudos mostraram que esta condição reproduz sobre a estrutura óssea, efeitos semelhantes aos observados em vôos espaciais (SCHNEIDER; McDONALD, 1984; LeBLANC et al., 1990).

1.2.1 Simulação em animais

Estudar o comportamento do tecido ósseo dos ratos tem sido, por muito tempo, um assunto de grande interesse, por causa da utilidade destes animais como modelo no estudo de doenças e alterações nas funções do sistema esquelético.

Os vôos espaciais induzem mudanças funcionais, morfológicas, metabólicas e bioquímicas similares em roedores e humanos (CAIOZZO et al., 1994). Portanto, animais como ratos são aceitos como modelos para estudos, respeitando algumas diferenças entre o comportamento dos tecidos dos ratos e dos tecidos dos humanos (por exemplo, a taxa de remodelação), o que impõe certas limitações na extrapolação dos resultados para os humanos (NORMAN et al., 2000). Mas, as vantagens ainda são superiores às desvantagens.

Os estudos onde os animais são mantidos em suspensão têm sido utilizados para simular as condições que acontecem em vôos espaciais ou outras condições que levam à restrição da atividade física. Embora o método produza condições diferentes da imobilização (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 (MATSUMOTO et al., 1998).

A idéia de utilizar a suspensão dos membros posteriores de ratos para estudar as conseqüências do descarregamento e ulterior carregamento ocorridos durante e após vôos espaciais, teve início na década de 70 pela *National Aeronautics and Space Administration (NASA)-Ames Research Center*.

Morey (1979) foi a primeira a descrever um modelo de suspensão para simular os efeitos do sub-carregamento do peso sobre os membros posteriores. A partir desta data, outros modelos e métodos foram descritos.

Em 1987, Wronski e Morey-Holton compararam a suspensão pelo quadril e a suspensão pela cauda, em ratos. Concluíram que a resposta do sistema esquelético varia de acordo com o método de suspensão. E o que mais se aproximou dos efeitos provocados pela microgravidade foi a suspensão pela cauda, sendo também, o que menos induziu problemas causados pelo sistema de fixação. Atualmente, o modelo de suspensão pela cauda é o mais utilizado e seus resultados podem ser considerados como os que mais se aproximam do que ocorre em vôos espaciais.

Segundo Morey-Holton e Globus (2002), o descarregamento dos membros posteriores de ratos, com a suspensão pela cauda (Figura 2), é um modelo aceito pela comunidade científica para simular os efeitos de vôos espaciais. O procedimento de operação padrão para descarregamento com aplicação em ratos jovens e adultos foi atualizado e aprovado pela *National Aeronautics and Space Administration (NASA)*, *Ames Research Center (ARC)*, *Institutional Animal Care and Use Committee* em Agosto de 2001, de acordo com os mesmos pesquisadores.

Figura 2 – Modelo de suspensão pela cauda. O animal realiza apoio com os membros anteriores e os membros posteriores ficam elevados, sem apoio (KASPER et al., 1993).

Os modelos que simulam os efeitos do sub-carregamento são de grande importância, pois são controlados e as modificações podem ser feitas quando necessárias durante a experiência. Além disso, manipulações podem ser executadas sem grandes precauções requeridas para experiências em vôos espaciais. Outro ponto importante é a acessibilidade e o baixo custo, quando o modelo de suspensão é comparado aos experimentos realizados em ambiente de microgravidade, a bordo de nave espaciais.

1.3 Treinamento

Segundo Hou et al. (1990) os efeitos dos exercícios sobre o sistema esquelético dependem de fatores como a intensidade do exercício, a maturidade esquelética, o tipo de osso (cortical ou trabecular) e a localização anatômica (diáfise, metáfise ou epífise).

Apesar das sérias implicações da perda de massa óssea e, conseqüentemente, a pré-disposição do esqueleto humano à fratura, ainda não existe uma contramedida estabelecida que mantenha a integridade óssea durante períodos de sub-carregamento do peso sobre a estrutura óssea (NORMAN et al., 2000).

O exercício físico é a contramedida mais estudada para amenizar ou prevenir a atrofia muscular e a perda de massa óssea. Estudos em animais com treinamento em esteiras relataram que houve aumento da massa óssea e da densidade mineral óssea (YEH et al., 1993; TUUKKANEN; PENG; VÄÄNÄNEN, 1994; Van der WIEL et al., 1995; MATHEY et al., 2002). Porém, no espaço, os exercícios físicos não tem sido uma contramedida eficiente para evitar as perdas de massa óssea (CAVANAGH; LICATA; RICE, 2005). Mas, de acordo com os autores esta afirmação poderá ser alterada, pois, nos estudos realizados faltam metodologias de controle e medidas mais eficazes.

Muitas vezes, o efeito benéfico do exercício requer um tempo relativamente mais longo (YEH et al., 1993; HAGIHARA et al., 2005). Isto é particularmente verdade quando se trabalha com ratos mais velhos, em que a heterogeneidade da amostra aumenta.

Estudos em animais usaram o treinamento em esteira para verificar a capacidade de reverter os efeitos de várias alterações, principalmente aquelas causadoras de perdas ósseas.

Yeh et al. (1993) determinaram a densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral ósseo (CMO) em ratos adultos e exercitados em esteira por 9 semanas e por 16 semanas, em protocolo de treinamento considerado moderado. Comparando os resultados obtidos dos animais do grupo de 9 semanas de treinamento com o controle, verificaram um aumento significativo da CMO no complexo fíbula-tíbia e da DMO nas vértebras. Na comparação do grupo de 16 semanas de treinamento os aumentos foram 9 e 5 vezes maiores da CMO e DMO, respectivamente. Portanto, em animais adultos o treinamento por um período maior causa maiores efeitos sobre a estrutura óssea.

Nordsletten et al. (1994) estudaram os efeitos do treinamento em esteira sobre o desenvolvimento da osteopenia em ratas ovariectomizadas. Os autores mostraram que o treinamento de alta intensidade causou efeitos diferentes entre as extremidades do fêmur.

Norman et al. (2000) concluíram que o exercício aeróbico moderado atenuou a perda óssea e a atrofia muscular em animais que passaram por um período de suspensão pela cauda.

Hagihara et al. (2005) estudaram os efeitos de diferentes frequências de corrida sobre a densidade mineral óssea em animais jovens. Eles concluíram que o treinamento moderado (de 4 a 5 dias por semana) aumentou a densidade mineral óssea.

1.4 Comportamento mecânico dos ossos

Devido à função estrutural que os ossos desempenham nos animais vertebrados, eles são constantemente submetidos a diversos tipos de esforços, à semelhança de uma estrutura utilizada na engenharia. Portanto, o estudo do comportamento mecânico dos ossos pode ser realizado usando os mesmos princípios e conceitos utilizados na engenharia.

Segundo Chiaverini (1979), as propriedades mecânicas definem o comportamento de um material, quando sujeito aos esforços de natureza mecânica e correspondem às propriedades que, num determinado material, determinam a sua capacidade de transmitir e resistir aos esforços aplicados, sem romper ou sem que se produzam deformações incontroláveis.

A relação entre a carga aplicada em uma estrutura e a deformação em resposta à carga pode ser observada em uma curva traçada num gráfico “carga x deformação”, ou, num gráfico “tensão x deformação” quando a estrutura ensaiada for um corpo de prova com dimensões conhecidas. Esta curva pode ser dividida em duas regiões: a região de deformação elástica (fase elástica) e a região de deformação plástica (fase plástica). O limite entre as duas regiões é chamado de limite de proporcionalidade ou limite elástico (Figura 3).

Figura 3 – Desenho teórico representativo das regiões de deformação elástica e plástica observadas em uma curva teórica tensão x deformação.

A região de deformação elástica imita o comportamento de uma mola, onde a deformação aumenta linearmente com o aumento da carga e, após a retirada da carga, retorna à forma original. Mas, nos ossos não se pode considerar como o comportamento de uma mola perfeita, pois, efeitos viscoelásticos durante a deformação, em função dos fluídos presentes na matriz óssea (TURNER; BURR, 1993), causam perda de energia elástica, em que pode ser observada quando se realiza um ensaio de carregamento e descarregamento. As curvas de carregamento e a de descarregamento não fazem o mesmo caminho, formando um ciclo fechado, o que representa um ciclo de histerese (SHIMANO; SHIMANO; VOLPON, 2002).

Já, na região plástica, o material estará com deformações permanentes mas, em muitos casos, esta região é importante, principalmente quando a ruptura não pode ocorrer imediatamente após o limite elástico. Ou seja, o material deverá absorver mais energia antes de romper.

A inclinação da curva carga x deformação na região elástica determina a rigidez e representa a rigidez extrínseca ou estrutural, onde os ossos maiores

possuem uma maior rigidez. Ao converter a carga em tensão e a deformação em deformação relativa, obtém-se uma curva tensão $\times$ deformação relativa e a inclinação desta curva na região elástica é o módulo de elasticidade ou módulo de Young e representa a rigidez intrínseca do material (TURNER; BURR, 1993). Esta diferença pode ser observada ao comparar ensaios em ossos inteiros (rigidez extrínseca) com ensaios realizados em corpos de prova de osso (rigidez intrínseca).

O tecido ósseo por ser formado de materiais de diferentes naturezas (colágeno e hidroxapatita), distribuídos de diferentes formas (lamelas ósseas, trabéculas, etc), dá aos ossos comportamentos mecânicos característicos como a viscoelasticidade, a anisotropia e a não homogeneidade.

O comportamento de um material viscoelástico pode ser considerado como sendo um conjunto dos comportamentos de um material elástico com o de um material viscoso (SEDLIN, 1965). Um material com comportamento elástico ideal é caracterizado pelo armazenamento de toda energia fornecida a ele durante o processo de deformação mecânica, na forma de energia potencial elástica, e é devolvida ao retirar-se o esforço que a causou, podendo ser exemplificado pelo comportamento de uma mola. Um material com comportamento viscoso se caracteriza por ter toda a energia a ele fornecida no processo de deformação mecânica, dissipada na forma de calor, o mesmo comportamento de um amortecedor. Uma caracterização dos materiais viscoelásticos é a dependência do comportamento mecânico com a taxa de carregamento, ou seja, velocidade de aplicação de carga. Burstein e Wright (1994) fizeram testes numa série de três corpos de prova de osso cortical, sendo cada um submetido a uma velocidade diferente de aplicação da carga e confirmaram a influência da velocidade de aplicação da carga nas propriedades mecânicas dos ossos.

Materiais anisotrópicos apresentam diferentes propriedades mecânicas quando testados em diferentes direções. Ou seja, o comportamento mecânico depende diretamente da direção e do sentido da força aplicada. E os materiais não homogêneos são aqueles cujo comportamento mecânico varia de região em um mesmo material.

A alta concentração de colágeno da fase orgânica permite ao osso resistir a tensões de tração. E, a fase inorgânica dá ao osso excelente resistência às tensões de compressão (TUREK, 1991).

Para o osso trabecular a definição de rigidez é mais difícil, pois ele é formado por trabéculas individuais, com rigidez própria, que formam toda a estrutura com uma única rigidez. O osso trabecular possui uma rigidez material que é a rigidez de cada trabécula e uma rigidez estrutural que é a rigidez da estrutura trabecular disposta espacialmente. A maioria dos estudos concentra-se nas propriedades estruturais devido à grande dificuldade do estudo em trabéculas individuais. As propriedades estruturais variam para as diferentes regiões anatômicas pois, dependem da densidade e da orientação trabecular.

Para medir as propriedades do osso trabecular, alguns métodos foram desenvolvidos para ensaiar vértebras e o colo femoral (HOU et al., 1990; ANDREASSEN; MELSEN; OXLUND, 1996). Para vértebras, uma força de compressão é aplicada ao corpo vertebral inteiro ou a uma secção do meio da vértebra, para se terem superfícies paralelas e planas. Para o colo femoral, uma força de compressão é aplicada à cabeça femoral que produz tensões de flexão e compressão.

Um trabalho interessante foi realizado por Hogan, Ruhmann e Sampson (2000) para estudar o comportamento do osso trabecular em ratas ovariectomizadas.

Estes autores retiraram da metáfise proximal das tíbias dos animais, secções transversais de 2mm de espessura, que eram compostas de osso trabecular no interior e contornado por osso cortical. Eles realizaram dois tipos de ensaio de compressão nestas secções. No primeiro, posicionaram a secção inteira entre dois pratos paralelos para compressão e, no segundo tipo, utilizaram um dispositivo para comprimir somente o osso trabecular do interior da secção.

Garber, McDowell e Hutton (2000) estudaram o comportamento mecânico de fêmures de ratos suspensos por duas e quatro semanas, submetidos a ensaio de flexão em três pontos. Compararam estes valores com a alteração geométrica e com a distribuição de cálcio na secção transversal. Concluíram que o decréscimo das propriedades mecânicas nos grupos suspensos foi principalmente devido à alteração na geometria óssea e não pela porcentagem de mineralização.

Tuukkanen, Peng e Väänänen (1994) inibiram a produção de testosterona em ratos por meio de orquiectomia e treinaram os animais em esteira. Verificaram que a orquiectomia promoveu redução significativa na massa óssea e no comportamento mecânico do colo femoral e o treinamento não reverteu estes efeitos.

1.5 Marcação óssea por tetraciclina

A formação do tecido ósseo é denominada osteogênese ou ossificação, que não têm o mesmo significado que calcificação. A osteogênese refere-se à formação de todos os componentes do osso e não simplesmente ao seu componente mineral (HAM, 1986).

Algumas substâncias incorporam-se nos tecidos em calcificação e exibem fluorescência ao serem iluminadas com luz ultravioleta. Desta maneira, pode-se analisar a neoformação óssea durante certo período para estudar o crescimento, a reposição, o remodelamento e o reparo ósseo (VOLPON, 1985).

De todas as substâncias que marcam o osso neoformado, a tetraciclina é a mais utilizada, pois apresenta vantagens como facilidade na obtenção da marcação, persistência por longo tempo da impregnação, nas doses recomendadas não é tóxica, é relativamente barata e vem pronta para uso.

Mas, para realizar este tipo de análise, o osso não pode ser descalcificado. Segundo Ham (1986) existem dois modos de preparar os cortes de osso calcificado. O primeiro é obtido pelo desgaste da amostra a partir de fragmentos ósseos. O outro é a utilização de micrótomos especiais. Como têm de ser preparadas a partir de osso seco, as células nestas preparações são eliminadas e, portanto, não é útil para o estudo das células ósseas. Mas, como a porção mineral continua presente no osso, a substância intercelular permanece rígida e, portanto, os canalículos mantêm-se abertos e podem ser vistos como linhas escuras. As lacunas que encerram os osteócitos podem também ser vistas como cavidades ovóides escuras. Os canais de

Havers e de Volkmann podem ser vistos neste tipo de preparação e também a disposição das lamínulas (camadas) de osso em torno dos canais de Havers.

A tetraciclina administrada *in vivo* incorpora-se no osso recém-formado em mineralização e apresenta fluorescência característica, quando examinada sob luz ultravioleta (TAPP, 1966).

O osso marcado por tetraciclina apresenta forte fluorescência de coloração amarelada a laranja, em fundo magenta fraco e o osso maduro apresenta uma fluorescência azul fraca. Após a injeção de tetraciclina, os níveis séricos permanecem suficientemente elevados para a captação adequada pelo osso neoformado. Na microscopia por fluorescência, observam-se faixas estreitas de fluorescência onde o osso foi ativamente formado enquanto esteve exposto à tetraciclina recentemente administrada.

Quando se administram duas doses de tetraciclina com intervalo de alguns dias, duas faixas de fluorescência estarão separadas por um intervalo de osso novo não rotulado que se formou durante o período entre as doses. Desse modo, pode-se medir a formação de osso novo. Trinta minutos após a injeção intraperitoneal no animal de experimentação, desenvolve-se uma fluorescência amarela difusa no osso. Depois de 24 horas, a fluorescência difusa desaparece, mas permanece permanentemente localizada como faixas amarelas brilhantes nos locais de formação muito ativa de osso novo (TUREK, 1991).

Wronski e Morey (1983) administraram tetraciclina em ratos antes e após vôo espacial de 18,5 dias de duração. Por meio da distância entre as duas marcações de tetraciclina, observaram que ocorreu diminuição da formação óssea periosteal durante o vôo espacial, mas, que foi corrigida no período após o vôo.

1.6 Objetivos

Objetivo geral

Analisar as alterações mecânicas e microscópicas ocorridas nos fêmures de ratos, quando submetidos à suspensão pela cauda e posterior liberação ou treinamento em esteira.

Objetivos específicos

1 – Analisar o comportamento mecânico do terço proximal de fêmures de ratos, quando submetidos a uma tensão de flexo-compressão.

2 – Obter um corpo de prova de osso cortical do fêmur de rato e analisar seu comportamento mecânico quando submetido ao ensaio de flexão em três pontos.

3 – Analisar, por meio de fluorescência óssea, possíveis alterações no terço proximal do fêmur e na diáfise femoral.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, de acordo com o protocolo nº 038/2003 (ANEXO A).

2.1 Animais

Ratas matrizes da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), prenhes e na fase inicial de gestação, foram fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto – USP e trazidas para o Biotério do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto – USP. Após a parturição foram selecionados seis filhotes fêmeas para cada rata mãe e os demais desprezados. O controle da idade dos filhotes foi feito a partir do nascimento e o desmame foi realizado 21 dias após a parturição.

As ratas permaneceram em gaiolas individuais, juntamente com seus filhotes até a idade do desmame. Após o período de amamentação, os filhotes foram divididos em duas gaiolas. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração e as gaiolas foram higienizadas de acordo com os procedimentos do laboratório.

Como existe competição por alimento, se for deixado um número menor que seis filhotes por mãe, ocorrerá o crescimento mais rápido dos animais. Então, para as ratas matrizes que não pariram um número suficiente de filhotes fêmeas, foram

deixados animais machos para completar os seis filhotes por mãe. Os machos foram deixados até o desmame e, posteriormente, excluídos. Para evitar o canibalismo materno foram tomadas algumas medidas como a aquisição de ratas matrizes na fase inicial de gestação e realizada a transferência mais precoce para o biotério para uma melhor adaptação às condições ambientais. Da mesma forma, os animais foram colocados em local com menor variação de luminosidade e temperatura e com pouco acesso de pessoas ao local.

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos, de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Número de animais	Procedimentos experimentais
Cont I (Controle I)	12	Animais submetidos à eutanásia com 90+28 dias de idade.
S (Suspensão)	14	Animais, inicialmente com 90 dias de idade, permaneceram suspensos pela cauda por 28 dias e submetidos à eutanásia.
Cont II (Controle II)	12	Animais submetidos à eutanásia com 90+28+21 dias de idade.
S-L (Suspensão e Liberado)	14	Animais, inicialmente com 90 dias de idade, permaneceram suspensos pela cauda por 28 dias e ficaram soltos com livre movimentação dentro de gaiolas por mais 21 dias e foram submetidos à eutanásia.
S-T (Suspensão e Treinado)	14	Animais, inicialmente com 90 dias de idade, permaneceram suspensos pela cauda por 28 dias e, depois, passaram por um período de treinamento de 21 dias em esteira e foram submetidos à eutanásia.
Total de animais	66	—

2.3 Técnica de suspensão

Os animais dos grupos S (suspenso), S-L (suspenso-liberado) e S-T (suspenso-treinado) foram suspensos pela cauda e, todos os procedimentos para suspensão do animal pela cauda foram baseados no trabalho de Silva e Volpon (2004) que utilizaram um modelo de suspensão elaborado a partir do citado por Kasper (1993).

2.3.1 *Preparo do animal*

Para a preparação da cauda do animal a ser colocado em suspensão, os ratos foram anestesiados com uma aplicação intramuscular da combinação de ketamina e xilazina na proporção de 30mg/kg e 3mg/kg, respectivamente.

Sob anestesia, a cauda do animal (Figura 4A) foi lavada com água e detergente e aplicada tintura de benjoim em toda pele, após a secagem completa. Em seguida, a cauda foi envolvida com espuma adesiva (Reston[®]), desde sua origem até os dois terços proximais, aproximadamente, com o objetivo de proteger a pele e evitar lesões cutâneas futuras (Figura 4B).

Sobre esta espuma adesiva foi aplicada uma bandagem elástica Coban[®] (modelo 1582 da marca 3M[®]), tensionada homogeneamente, de modo a envolver toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocado um cordão estreito fixado por enfaixamentos adicionais, de modo a formar uma alça que serviu para prender o animal ao sistema de suspensão (Figura 4C), por meio de uma presilha.

Em seguida, com o animal ainda anestesiado, a extremidade da cauda não enfaixada foi amputada, para evitar necrose (Figura 4D).

Figura 4 – Desenho esquemático dos procedimentos de preparação do animal para a suspensão pela cauda. (A) Cauda do animal. (B) Posicionamento de duas espumas adesivas (Reston®). (C) Aplicação da bandagem elástica (Coban® - modelo 1582 da marca 3M®) envolvendo toda a espuma e a colocação de um cordão estreito para formar uma alça. (D) Amputação da extremidade não enfaixada, para evitar necrose.

Após os procedimentos de preparação da cauda foi aplicado ketoprofeno intramuscular no membro posterior (analgésico e antiinflamatório) na dose de 3,5mg/kg. Esta aplicação foi repetida uma vez ao dia, por três dias consecutivos.

2.3.2 Sistema de suspensão

O sistema de suspensão também foi semelhante ao utilizado por Silva e Volpon (2004) e composto por uma gaiola de duas partes e um sistema de fixação do animal.

A parte inferior da gaiola foi formada por uma caixa de acrílico transparente de modo a permitir a visualização e o controle do animal, com 35,0cm de largura, 35,0cm de comprimento e 21,5cm de altura, aberta superiormente. Através de uma perfuração na parede lateral dessa caixa foi introduzido o bico do reservatório de água.

Sobre essa caixa foi colocada uma gaiola de metal na posição invertida, com encaixes nas laterais para garantir perfeita fixação com a caixa de acrílico. Em uma das laterais foi colocada uma alça de arame que serviu de suporte para a garrafa de água. Esta parte superior foi também utilizada como suporte para o sistema de fixação do animal. As duas caixas foram acopladas de modo que ficassem encaixadas pelas aberturas, formando um compartimento único (Figura 5).

A estrutura da gaiola permitiu aos animais movimentação com os membros dianteiros, porém mantendo os membros posteriores suspensos, sem apoio no piso da gaiola ou nas paredes laterais.

Figura 5 – Gaiola para suspensão dos animais. (A) Gaiola de metal. (B) Caixa de acrílico transparente. (C) Conjunto montado.

O sistema de fixação (Figura 6) foi composto por:

- Uma presilha para o encaixe da alça que faz parte do sistema de acoplamento do animal;

-Uma haste de aço retilínea rosqueada com 40,0cm de comprimento e 4,5mm de diâmetro;

-Chapas de alumínio presas por porcas para delimitar o espaço de movimentação do animal no interior da gaiola, sendo que o limite de curso para a movimentação foi de 25,0cm.

-Porcas sextavadas;

-Porcas do tipo borboletas e arruelas para fixar a haste na grade da gaiola;

Figura 6 – Desenho esquemático do sistema de fixação do animal na gaiola para suspensão.

A alça da cauda do animal foi presa na presilha do sistema de suspensão. A altura do animal foi regulada até que os membros posteriores ficassem totalmente suspensos e o sistema de suspensão foi travada nesta posição pela porca borboleta na gaiola de metal (Figura 7).

Figura 7 – Desenho esquemático do rato suspenso pela cauda.

No assoalho da gaiola foram colocadas a ração e maravalhas para higienização que foram trocadas a cada quatro dias. Neste sistema os animais puderam se movimentar e ter acesso à água e à ração.

Após o período de suspensão, os animais do grupo S (suspenso) foram submetidos à eutanásia. E, os animais dos grupos S-L (suspenso-liberado) e S-T (suspenso-treinado) foram retirados das gaiolas de suspensão, marcados e colocados em gaiolas simples com três animais cada.

Apesar dos procedimentos para proteção da cauda, não foi possível evitar lesões graves, portanto, a cauda foi totalmente amputada para evitar infecções. Para a amputação, os animais foram anestesiados com uma aplicação intramuscular da

combinação de 30,0mg/kg de ketamina e 3,0mg/kg de xilazina. A amputação foi realizada no momento em que os animais foram retirados da suspensão.

2.4 Treinamento

Os animais do grupo S-L permaneceram nas gaiolas simples por 21 dias sem nenhuma atividade física, apenas os movimentos normais dentro da gaiola. E, os animais do grupo S-T foram treinados em uma esteira motorizada Insight® - modelo EP-131, composta por seis baias individuais com altura de 15,0cm, largura interna de 10,0cm e comprimento de 50,0cm. A carenagem era de acrílico de 5,0mm de espessura e possuía, também, um transferidor de angulação acoplada ao eixo para o controle da inclinação que podia variar de 0 a 90 graus (Figura 8).

Figura 8 – Esteira motorizada para ratos da marca Insight® - modelo EP-131.

A esteira era equipada com um painel de controle com regulador de velocidade, chave liga-desliga, mostrador digital para o tempo e a distância percorrida e botões para reiniciar o relógio e o contador de distância.

Para a exercitação dos ratos na esteira foi seguido o protocolo utilizado por Norman et al. (2000). O período de treinamento foi iniciado no dia seguinte ao término da suspensão, com 10 minutos por dia. Foram acrescentados cinco minutos por dia até chegar a 60 minutos de treinamento diários. Este aumento progressivo no tempo de treinamento foi para que o animal se adaptasse ao exercício. A velocidade média da esteira foi de 17m/min, na posição horizontal (sem inclinação).

Os animais foram submetidos a este protocolo de treinamento durante 21 dias, sendo que foram treinados por 3 dias consecutivos, seguidos por um dia sem treinamento (descanso/recuperação) (Figura 9).

Figura 9 – Esquema dos dias e periodização do treinamento.

2.5 Análise mecânica

Após o período de experimento, os animais foram pesados e depois foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental. Os fêmures foram retirados, limpos das partes moles, pesados e identificados para, então, serem envolvidos em gaze umedecida em solução fisiológica e conservados a -20°C .

Doze horas antes do início dos processos de preparação dos corpos de prova para realização dos ensaios mecânicos, os ossos foram retirados da temperatura de -20°C e mantidos em geladeira com temperatura média de 1°C e, duas horas antes, foram colocados em temperatura ambiente que variou entre 25°C e 27°C , para entrar em equilíbrio térmico com o meio ambiente.

Foram feitas pesagens dos animais no início e no final dos principais procedimentos. Os animais foram pesados numa balança digital com precisão de 5g e os fêmures foram pesados numa balança eletrônica Marte[®] - modelo AS2000C com precisão de 0,01g.

Para todos os cortes dos ossos foi utilizada uma cortadeira metalográfica ISOMET 1000 – marca BUEHLER[®] e uma máquina para serrar material biológico construída no próprio laboratório.

Todos os ensaios mecânicos foram realizados em uma máquina universal de ensaio EMIC[®]-10000N, no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Para a obtenção das forças exercidas foram usadas, de acordo com o tipo de ensaio, células de carga com capacidades diferentes. As deformações foram captadas pelos sensores internos de deslocamento da máquina.

Com um computador acoplado à máquina universal de ensaio e o programa de computador TESC[®] v2.1 foi possível controlar todos os parâmetros dos ensaios e obter o valor da força referente a cada deslocamento, ou seja, pontos de força x deslocamento. A aquisição destes pontos foi realizada em intervalos não padronizados de tempo definidos pelo programa.

O programa de computador TESC[®] v2.1 emitiu um arquivo de extensão *.txt* para cada ensaio. Este arquivo continha todos os pontos adquiridos durante os ensaios [tempo (s) x deslocamento (mm) x força (N)]. Com estes pontos e o programa de computador Excel[®] foi possível construir os gráficos e calcular as propriedades mecânicas.

O fêmur esquerdo foi destinado ao ensaio de flexo-compressão no terço proximal e para análise da incorporação da tetraciclina na região diafisária. O fêmur direito serviu para obtenção de corpo de prova da região diafisária e para análise da incorporação de tetraciclina no terço proximal. Estes procedimentos serão detalhados a seguir.

2.5.1 Fêmur esquerdo (terço proximal)

Neste osso o objetivo foi analisar algumas propriedades mecânicas da extremidade proximal dos fêmures de ratos. O ensaio consistiu em aplicar uma força vertical na cabeça femoral até a ruptura total (Figura 10A).

A força aplicada durante a realização do ensaio teve apenas uma componente vertical, mas devido à distância d entre o ponto de aplicação da força e a linha neutra, aparecem tensões de flexão (momento fletor M) (Figura 10B), portanto, o ensaio foi considerado de flexo-compressão.

Figura 10 – Desenho esquemático do ensaio realizado no fêmur esquerdo (A) Força vertical aplicada na cabeça do fêmur. (B) Diagrama de forças na extremidade proximal do fêmur durante o ensaio de compressão.

Para a realização destes ensaios foi necessária a inclusão em acrílico da extremidade distal dos fêmures para a fixação na posição vertical.

2.5.1.1 Inclusão em acrílico

Os procedimentos realizados para a inclusão foram:

- Confecção do acessório;
- Posicionamento dos fêmures;
- Inclusão na resina.

a) Confecção do acessório

Foi elaborado e confeccionado um acessório para inclusão em acrílico de até seis fêmures (Figura 11).

Figura 11 – Desenho esquemático do acessório confeccionado para a inclusão da porção distal dos fêmures dos ratos em acrílico. (A) Acessório desmontado. (B) Primeira montagem para colagem e alinhamento dos fêmures. (C) Acessório montado.

O acessório foi confeccionado em latão e alumínio no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. E, antes de

iniciar os procedimentos de inclusão, o acessório foi untado com óleo Singer® para facilitar a retirada do conjunto acrílico-osso.

A utilização deste acessório otimizou a inclusão dos fêmures, visto que em trabalhos anteriores as inclusões foram feitas individualmente, o que demandava mais tempo. Portanto, foi possível realizar os ensaios mecânicos no mesmo dia da inclusão, não havendo necessidade de novo congelamento.

b) Posicionamento dos fêmures

Primeiramente, os fêmures foram fixados com cola Araldite® e presos com elásticos para mantê-los na posição vertical até o endurecimento da cola (Figura 12A). Depois, os elásticos foram cortados (Figura 12B) e o acessório fechado para o recebimento da resina acrílica (Figura 12C).

Figura 12 – Ilustração dos principais passos para o posicionamento dos fêmures no acessório para a inclusão em resina acrílica. (A) Colagem e posicionamento dos fêmures no acessório. (B) Fêmures colados na base do acessório. (C) Acessório fechado e pronto para receber a resina.

c) Inclusão em resina

Foi utilizado o acrílico autopolimerizante JET - Clássico® na proporção volumétrica de 2,0 ml de pó para 1,0 ml de solvente. A mistura dos componentes foi feita em recipiente de plástico, a partir do qual foi realizado o vazamento do acrílico no acessório (Figura 13).

Figura 13 – Acessório contendo os fêmures e preenchido com resina.

A polimerização do acrílico ocorreu em aproximadamente 6 minutos com reação exotérmica. Portanto, o conjunto foi colocado em um recipiente com água gelada para evitar aquecimento excessivo. Durante todo o procedimento de inclusão, a parte exposta do fêmur foi mantida umedecida com soro fisiológico.

Após a polimerização completa do acrílico, o acessório foi aberto (Figura 14) e o conjunto acrílico-osso foi retirado (Figura 15).

Figura 14 – Acessório aberto para retirada do conjunto acrílico-osso.

Figura 15 – Conjuntoacrílico-osso pronto para o ensaio.

2.5.1.2 Ensaio mecânico

O conjuntoacrílico-osso foi preso em uma morsa acoplada à base da máquina universal de ensaio. Foi aplicada uma força vertical na cabeça femoral até a ruptura por meio de um acessório com 2mm de diâmetro conectado diretamente a uma célula de carga com capacidade máxima de 200kgf. A velocidade de aplicação da força foi de 0,1mm/min (Figura 16).

Figura 16 – Detalhe da realização do ensaio com aplicação da força na cabeça femoral.

2.5.1.3 Propriedades mecânicas

Destes ensaios foram obtidos gráficos força x deformação de onde foi possível obter como propriedades mecânicas a rigidez e a força máxima (FM) (Figura 17).

Figura 17 – Desenho esquemático do gráfico força x deformação obtido do ensaio mecânico na cabeça do fêmur esquerdo de ratas.

Rigidez – é obtida pelo cálculo da tangente do ângulo θ , formado pela reta que representa a inclinação da curva força x deformação na região elástica e o eixo horizontal. Neste caso, a rigidez é da estrutura (rigidez extrínseca), e quanto maior este valor, maior será a força necessária para obter uma mesma deformação elástica.

Força máxima – é o valor máximo da força suportada pela estrutura. Pode ser obtida do gráfico ou diretamente pela planilha de valores dos pontos gerados durante o ensaio mecânico.

2.5.1.4 Análise radiográfica

Após a realização dos ensaios, o conjunto acrílico-osso foi radiografado por um equipamento da marca Dabi Atlante® – modelo Spectro 70x (Figura 18).

Figura 18 – Equipamento de radiografia odontológica. Marca Dabi Atlante® – modelo Spectro 70x – classe I tipo B comum.

A incidência foi ântero-posterior por um tempo de exposição de 0,15 segundo. A tensão nominal máxima do equipamento foi de 70kVp e a corrente nominal máxima de 10mA. Foram utilizados filmes radiográficos periapical – oclusal – M2 (5cm x 7cm) da marca AGFA®. Um suporte em acrílico foi confeccionado para padronizar a distância de 5,0cm do foco radiográfico até o filme (Figura 19).

Figura 19 – Detalhes do posicionamento do conjunto acrílico-osso sobre o filme radiográfico e sob o foco do equipamento de radiografia.

Para a revelação do filme radiográfico foram utilizados os procedimentos de rotina, tomando o cuidado para que todos os filmes ficassem o mesmo tempo no revelador e no fixador. As radiografias foram digitalizadas com 1200dpi de resolução utilizando um *scanner* Genius® modelo ColorPage – HR7x Slim. As imagens foram ampliadas e as fraturas analisadas (Figura 20).

Figura 20 – Radiografia. (A) Conjunto acrílico-osso. (B) Ampliação do terço proximal do fêmur após ensaio, ilustrando a fratura (seta).

2.5.2 Fêmur direito (osso cortical da diáfise anterior)

Para análise do comportamento mecânico do osso cortical foi retirado um corpo de prova da face anterior da diáfise do fêmur direito (Figura 21).

Figura 21 – Esquema do local da obtenção do corpo de prova (face anterior da diáfise do fêmur de ratos).

2.5.2.1 Obtenção do CDP

O procedimento para obtenção do corpo de prova foi dividido em três etapas:

- a) Marcação dos fêmures;
- b) Retirada do terço proximal;
- c) Cortes longitudinais;

a) Marcação dos fêmures

Primeiramente, foi medido o comprimento dos fêmures e foram feitas marcações para identificar e padronizar os locais para os cortes. Foi feita uma marcação na face anterior da região médio-diafisária do fêmur, para identificar o meio do osso. Depois, foram feitas mais duas marcações à distância de seis milímetros, uma proximal e outra distal, a partir da primeira marca (Figura 22).

Figura 22 – Marcação dos fêmures para identificação dos locais para os cortes. (A) Medida do comprimento total para fazer a marcação. (B) Marcação centrais.

b) Retirada do terço proximal

O primeiro corte realizado foi para a retirada do terço proximal do fêmur (Figura 23). Este corte foi feito na máquina para serrar material biológico. O disco e o osso foram refrigerados com água durante todo o corte.

Figura 23 – Corte para retirar o segmento proximal do fêmur.

c) Cortes longitudinais

Após a retirada do segmento proximal do fêmur, o restante do osso foi preso pela extremidade distal em um acessório e posicionado na cortadeira metalográfica de modo que a parte da região médio-diafisária ficasse em contato com os discos de corte (Figura 24A e Figura 24B). A cortadeira foi equipada com dois discos diamantados e serrilhados de 0,15mm de espessura e 75mm de diâmetro. Os discos foram posicionados paralelamente a uma distância de 1,4mm entre eles (Figura 24C). A rotação dos discos de corte foi de 300rpm. Este corte foi realizado até a terceira marcação (Figura 24D, Figura 24E e Figura 24F).

Figura 24 – Realização dos cortes paralelos. (A) Cortadeira metalográfica. (B) Desenho esquemático do sistema para realização dos cortes. (C) Posicionamento do osso sobre os dois discos distanciados de 1,4mm. (D) Corte sendo realizado. (E) e (F) Final do corte até a marcação mais distal.

Após estes cortes foi realizado um último corte transversal na marcação mais distal. Este corte foi realizado na máquina para serrar material biológico (Figura 25).

Figura 25 – Detalhes dos cortes para obtenção do corpo de prova de fêmures de ratos. (A) Detalhe dos cortes paralelos. (B) Corpo de prova obtido.

Após a obtenção do corpo de prova foram feitas medidas da altura e da largura da secção transversal. Para realização destas medidas foram utilizados um paquímetro digital (precisão de 0,01mm) e um micrômetro digital (precisão de 0,001mm).

2.5.2.2 Ensaio mecânico

Após a obtenção das medidas dimensionais, o corpo de prova foi posicionado em um acessório projetado especialmente para realização dos ensaios de flexão em três pontos, confeccionado pela Oficina Mecânica de Precisão da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto – USP (Figura 26).

Figura 26 – Desenho do acessório confeccionado para realização dos ensaios de flexão em três pontos em corpos de provas de fêmures de ratos.

A Figura 27 apresenta detalhes do posicionamento do CDP no acessório, que foi apoiado sobre os dois cilindros de 2,0mm de diâmetro. A distância entre eles foi de 7,0mm e o pino de aplicação da força foi posicionado no centro dos dois apoios.

A aplicação da força foi no centro do corpo de prova e no sentido da face periosteal (externa) para a face endosteal (interna).

Figura 27 – Posicionamento do corpo de prova no acessório para ensaio de flexão em três pontos.

Este conjunto foi posicionado na base da máquina universal de ensaio e o pino de aplicação da força foi posicionado sob uma célula de carga com capacidade máxima de 5kgf. A velocidade de aplicação da força foi de 0,1mm/min.

2.5.2.3 Propriedades mecânicas

Destes ensaios foram obtidos valores da força e da deflexão (flecha). Mas, neste caso, foi possível a obtenção de gráficos tensão x deflexão (flecha).

A tensão em ensaios de flexão em três pontos é o valor da tensão de tração ou compressão das fibras mais externas do corpo de prova durante o ensaio de flexão, e pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\sigma = \frac{Mc}{I} \quad (1)$$

Onde:

M = momento fletor na secção onde se quer determinar a tensão;

c = distância da linha neutra até o ponto de aplicação da força;

I = momento de inércia inicial da secção transversal.

Em um ensaio de flexão em três pontos, o momento fletor máximo estará no ponto de aplicação da força e será a força de reação (gerada pelo apoio) multiplicada pela distância do ponto de apoio até o ponto de aplicação da força.

O diagrama que representa a variação do momento fletor M ao longo de uma amostra submetida a uma força F no ponto médio entre dois apoios situados a uma distância L entre si, está apresentado na Figura 28.

Figura 28 – Diagrama das forças e do momento fletor M ao longo de uma amostra submetida a flexão em três pontos.

Deste diagrama observa-se que o momento fletor onde foi aplicada a força tem valor $\frac{F.L}{4}$. E, para corpos de prova com secção retangular uniforme, com altura h e largura b , o momento de inércia da área transversal é dado por $I = \frac{b.h^3}{12}$.

Portanto, a equação (1) fica:

$$\sigma = \frac{3FL}{2bh^2} \quad (2)$$

A tensão foi calculada para cada ponto coletado, possibilitando a criação de gráficos tensão x deflexão. Destes gráficos foram calculados os valores das seguintes propriedades mecânicas:

- a) Limite de proporcionalidade (tensão e deflexão);
- b) Módulo de elasticidade ou módulo de Young;
- c) Tensão máxima;
- d) Módulo de tenacidade.

a) Limite de proporcionalidade ou limite elástico – é o ponto imaginário que divide a região elástica da região plástica. É definido como a maior tensão que o material pode suportar, sem deixar qualquer deformação permanente quando descarregado.

Nos ensaios onde não é possível a observação nítida do limite de escoamento, pode ser determinado o limite n . Segundo Souza (1982), este limite é um valor convencionado internacionalmente para substituir o limite de escoamento. É calculado por meio de um aumento de $n\%$ na deformação, após a fase elástica. Geralmente o valor de n é especificado em 0,2%.

Para a determinação deste limite foi criada uma metodologia que consistiu em obter a equação da reta de um trecho linear da fase elástica (Figura 29A). A partir desta equação foi obtida uma reta deslocada 0,2% que possibilitou a determinação do limite de proporcionalidade, exatamente no ponto onde esta reta e a curva tensão x deflexão se cruzaram (Figura 29B).

Figura 29 – Desenho esquemático da obtenção do limite de proporcionalidade. (A) Determinação da equação da reta na fase elástica. (B) Limite de proporcionalidade exatamente no ponto onde a curva e a nova reta se cruzam.

Em todos os gráficos de todos os grupos, o trecho da fase elástica, que apresentou maior linearidade foi entre as tensões de 50MPa e 120MPa. Portanto, a equação da reta foi obtida desta parte da curva que consistiu em criar a linha de tendência linear e, conseqüentemente, o valor de R-quadrado também foi obtido (Figura 30). O R-quadrado variou de 0,997 a 1 em todos os casos.

Figura 30 – Obtenção da equação da reta entre as tensões de 50MPa e 120MPa, a partir da criação da linha de tendência linear em um dos gráficos obtidos do ensaio de flexão de três pontos no corpo de prova de osso cortical obtido do fêmur de rato.

A partir da equação da reta (Figura 30), onde y é a variável que representa a tensão e x a variável representativa da deflexão, foram determinadas novas deflexões acrescidas de 0,2% para as tensões. Ou seja, para cada tensão (y) uma nova deflexão (x') foi determinada (Equação 3).

$$x' = \frac{y - 8,1488}{637,57} + \left(\frac{y - 8,1488}{637,57} \right) * 0,002 \quad (3)$$

Esta nova reta foi traçada juntamente com a curva (Figura 31).

Figura 31 – Gráfico apresentando a curva e a reta deslocada 0,2% para determinação do limite de proporcionalidade.

O limite de proporcionalidade foi o ponto onde a reta e a curva se cruzaram.

Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa de computador Excel[®].

b) Módulo de elasticidade ou módulo de Young – é a medida da rigidez do material (rigidez intrínseca). Quanto maior este módulo, menor será a deformação elástica resultante da aplicação de uma tensão e mais rígido será o material (SOUZA, 1982). De acordo com Timoshenko e Noronha (1945), o módulo de elasticidade do material obtido de um corpo de prova com secção transversal retangular submetido a ensaio de flexão é dado por:

$$E = 0,25 \frac{FL^3}{kbh^3} \quad (4)$$

Onde k é a deflexão (flecha) medida para cada carga F aplicada.

De acordo com a expressão (4) o cálculo do módulo de elasticidade em ensaios de flexão é realizado para uma única tensão. Mas, utilizando-se uma planilha, foram calculados os valores do módulo de elasticidade em todos os pontos entre as tensões de 50MPa e 120MPa registrados pela máquina universal de ensaio. O valor final desta propriedade foi a média aritmética destes valores.

c) Tensão máxima – é o valor máximo da tensão durante um ensaio e é calculado na força máxima atingida no ensaio (F_{max}).

$$\sigma_{max} = \frac{3F_{max}L}{2bh^2} \quad (5)$$

Ou pode ser obtida pelo ponto mais alto do gráfico tensão x deflexão.

d) Módulo de tenacidade – Segundo Souza (1982), é a quantidade de energia absorvida por unidade de volume até a fratura, ou a quantidade de energia por unidade de volume que o material pode resistir sem causar a sua ruptura. A primeira definição está relacionada com a energia até o final do ensaio e a segunda com a energia somente até a carga máxima suportada pelo material ou estrutura.

No caso do ensaio realizado no CDP de osso cortical, a tenacidade calculada foi baseada na primeira definição e foi determinada calculando a área abaixo da curva tensão x deflexão.

O conceito de tenacidade é importante para estruturas que não podem fraturar quando são submetidas a tensões estáticas ou dinâmicas acima do limite de proporcionalidade.

2.6 Análise microscópica

Foram feitas análises da impregnação de material fluorescente durante a formação óssea. Como corante fluorescente foi usada a oxitetraciclina da marca Sigma[®], injetada por via intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia, na proporção de 50mg/kg de massa corporal (VOLPON, 1985).

2.6.1 Terço proximal do fêmur

Para esta análise foi utilizada a parte proximal do fêmur direito, de onde foram retiradas secções no plano frontal (Figura 32).

Figura 32 – Desenho esquemático das secções retiradas da parte proximal do fêmur direito para análise microscópica.

Para a obtenção destas secções foram realizados os seguintes procedimentos:

- a) Inclusão em acrílico;
- b) Cortes das secções;
- c) Montagem das lâminas.

a) Inclusão em acrílico

Para a inclusão em acrílico os ossos foram, primeiramente, desidratados em uma seqüência de diferentes concentrações de álcool etílico. Eles ficaram dois dias em álcool 50%, depois mais dois dias em álcool 70% e dois em 90%. Após este período, os ossos foram mantidos em álcool absoluto (100%) por mais quatro dias e, depois ficaram vinte minutos expostos ao ar para a evaporação do álcool.

Após a secagem completa, os fragmentos ósseos foram posicionados com a extremidade proximal para baixo e a região diafisária para cima dentro de um molde confeccionado para inclusão de até seis fragmentos ósseos simultaneamente (Figura 33).

Figura 33 – (A) Molde confeccionado para inclusão em acrílico dos fragmentos ósseos. (B) Detalhe do posicionamento do fragmento ósseo dentro dos compartimentos do molde.

Após o posicionamento dos fragmentos ósseos o molde foi preenchido com a resina T208 misturada com monômero de estireno e catalisador. Para cada 40,0ml de resina foram misturados 3,2ml de monômero e 0,8ml de catalizador. O monômero funciona como solvente para a resina, deixando-a menos viscosa e também reduz a formação de bolhas de ar durante o processo de polimerização.

Logo após o preenchimento, o molde foi colocado em uma câmara de vácuo para retirar as bolhas de ar (Figura 34). A intensidade do vácuo e o tempo que o molde permaneceu na câmara de vácuo não foram controlados, ficando como critério de finalização a eliminação completa das bolhas, sob controle visual.

Figura 34 – Câmara de vácuo utilizada para retirar as bolhas de ar da resina.

A polimerização completa da resina foi de aproximadamente 24 horas. Os blocos de resina com os ossos foram retirados do molde e armazenados em recipientes escuros (Figura 35).

Figura 35 – Bloco de resina acrílica contendo o terço proximal do fêmur incluído.

b) Cortes das secções

Após a obtenção dos blocos, eles foram presos em um acessório e posicionados na cortadeira metalográfica, equipada com um disco diamantado de 0,15mm de espessura e 7,60cm de diâmetro. Foram obtidas duas secções na espessura aproximada de 0,20mm (Figura 36).

Figura 36 – Detalhes da realização do corte para montagem da lâmina.

c) Montagem das lâminas

Posteriormente aos cortes, os espécimes foram desgastados manualmente em lixa d'água 600 até a espessura aproximada de 100 μ m. Os cortes assim preparados foram posicionados entre lâminas e lamínulas preenchidas com Enthelan[®] e conservados em ambiente escuro até serem analisados.

2.6.2 Diáfise femoral

Após as realizações dos ensaios de flexo-compressão e das radiografias foram retiradas secções transversais da região médio-diáfisária dos fêmures esquerdos (Figura 37).

Figura 37 – Desenho esquemático das secções transversais retiradas da região médio-diáfisária do fêmur esquerdo para análise microscópica.

Para a obtenção das secções transversais foi retirado um fragmento ósseo de aproximadamente 6mm de comprimento da região médio-diáfisária de cada fêmur esquerdo (Figura 38).

Figura 38 – Desenho esquemático do fragmento retirado do meio da diáfise do fêmur esquerdo para obtenção de secções transversais para a análise microscópica.

Os fragmentos ósseos passaram pelos mesmos processos realizados nos terços proximais dos fêmures direitos. Foram desidratados em álcool, incluídos em resina acrílica, serrados e obtidas secções na espessura de 0,2mm, lixadas até 100µm de espessura e montadas as lâminas. Os cortes foram realizados de modo a serem obtidas de duas a quatro secções transversais de cada osso.

2.6.3 Análise

O exame por fluorescência óssea foi realizado por epiiluminação com incidência de luz ultravioleta. As imagens foram captadas por uma filmadora digital Sony® Modelo SSC-DC54 acoplada a um microscópio Zeiss® com lentes da mesma marca e convertidas em formato digital por um equipamento Vídeo Snapshot SNAPPY®.

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa *SigmaStat*[®] v.2.03. Foram realizados testes para comparar a massa corporal e as propriedades mecânicas obtidas do fêmur esquerdo (terço proximal) e do fêmur direito (CDP de osso cortical da diáfise anterior).

A comparação da massa corporal foi realizada para verificar a ocorrência de ganho ou perda de massa após os procedimentos experimentais. Portanto, foram aplicados testes estatísticos pareados nos grupos. Foi utilizado o teste t pareado (*Paired t-test*) nos grupos Cont I e S (suspensão), e o teste de análise de variância para medidas repetidas de uma via (*One Way Repeated Measures Analysis of Variance*) nos outros grupos.

Inicialmente à aplicação dos testes estatísticos nas propriedades mecânicas, foram realizadas análises de normalidade e de igualdade de variância. Para realizar a comparação dos grupos Cont I x Cont II e dos grupos Cont I x S foi utilizado o teste *t*, para dados paramétricos. Outra comparação realizada foi entre os grupos Cont II x S-L (suspensão-liberado) x S-T (suspensão-treinado), neste caso foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA de uma via (*One Way Analysis of Variance*) para dados paramétricos e o teste de análise de variância de *Kruskal-Wallis* (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*) para dados não paramétricos. E, foi aplicado o teste de *Tukey* para comparar os pares de grupos quando o teste ANOVA detectasse diferença estatística.

Em todas as análises foi usado o valor de 5% como nível de significância.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

Para os resultados finais foram considerados todos os animais que não apresentaram problemas durante os procedimentos experimentais. Estes problemas foram: peso muito abaixo da média no dia do início dos procedimentos (um animal do grupo Cont I, um animal do grupo S e um do grupo S-L); morte por causa desconhecida (um animal do grupo Cont I); ruptura da cauda durante a suspensão (três animais do grupo S, dois do grupo S-L e um do grupo S-T); perda excessiva de peso durante os procedimentos (um animal do grupo S-L) e dois animais do grupo S-T não conseguiram se adaptar ao protocolo de treinamento.

Além disso, dois resultados foram desprezados (um do grupo S-L e um do grupo S-T) por apresentarem comportamento mecânico muito diferente em relação aos outros espécimes. Neste caso, todos os outros resultados obtidos destes animais foram descartados. Nos gráficos apresentados na Figura 39 estão destacadas as curvas dos animais desprezados.

Figura 39 – Gráficos dos ensaios de compressão realizados no terço proximal dos fêmures dos grupos S-L e S-T. Destaque para as curvas que foram desprezadas por apresentarem comportamento muito diferente do comportamento das outras curvas.

3.1 Massa

A massa corporal dos animais do grupo Cont I (controle I) teve um aumento significativo ($p < 0,001$) de 4,4% após o período de 28 dias. No grupo S (suspensão), os animais perderam significativamente ($p = 0,003$) 7,26% da massa corporal após 28 dias de suspensão. Os animais do grupo Cont II (controle II) ganharam significativamente ($p < 0,001$) 4,65% de massa corporal nos primeiros 28 dias e mantiveram o peso pelos próximos 21 dias ($p = 0,405$). No grupo S-L (suspensão-liberado), os animais perderam significativamente ($p < 0,001$) 6,24% da massa corporal após o período de suspensão e com a liberação eles ganharam significativamente ($p < 0,001$) 7,51% de massa corporal, ou seja recuperaram a massa perdida. E os animais do grupo S-T (suspensão-treinado), após perderem significativamente ($p < 0,001$) 5,25% da massa corporal com a suspensão, aumentaram significativamente ($p < 0,001$) a massa em 12,61% com o treinamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios das massas corporais após cada procedimento experimental e dos fêmures.

Massas (g)						
Grupos		Fases experimentais			Fêmur esquerdo	Fêmur direito
		Início da suspensão (90 dias de idade)	Final da suspensão e início da liberação ou treinamento (118 dias de idade)	Final da liberação ou treinamento (139 dias de idade)		
Cont I	Média	318,00	332,00		1,09	1,11
	Desv. Pad.	25,19	24,29		0,11	0,10
S	Média	310,00	287,50		1,08	1,06
	Desv. Pad.	25,28	33,69		0,06	0,09
Cont II	Média	331,67	347,08	350,00	1,13	1,14
	Desv. Pad.	23,09	23,40	25,23	0,10	0,12
S-L	Média	347,22	325,56	350,00	1,14	1,16
	Desv. Pad.	30,01	25,79	18,54	0,09	0,08
S-T	Média	314,00	297,50	335,00	1,15	1,15
	Desv. Pad.	18,68	27,51	25,39	0,07	0,08

3.2 Propriedades mecânicas do terço proximal do fêmur esquerdo

Dos ensaios mecânicos realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo das ratas foram obtidos gráficos força x deformação (Figura 40, Figura 41, Figura 42, Figura 43 e Figura 44). A Tabela 2 apresenta os valores médios da rigidez e da força máxima de todos os grupos experimentais.

Figura 40 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo Cont I (controle I).

Figura 41 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo S (suspensão).

Figura 42 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo Cont II (controle II).

Figura 43 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo S-L (suspenso-liberado).

Figura 44 – Gráficos dos ensaios realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo S-T (suspenso-treinado).

Tabela 2 – Valores médios da rigidez e da força máxima obtidos dos ensaios realizados no terço proximal do fêmur esquerdo das ratas.

Propriedade mecânica		Grupos				
		Cont I	S	Cont II	S-L	S-T
Rigidez ($\times 10^3$ N/m)	Média	209,37	189,81	287,17	269,13	275,32
	Desv. Pad.	64,46	66,26	77,15	46,68	62,73
Força máxima (N)	Média	101,46	86,32	115,05	104,93	115,44
	Desv. Pad.	10,53	13,47	12,57	12,94	15,54

Estes resultados foram analisados estatisticamente e estão ilustrados em gráficos apresentados a seguir. E, os valores das propriedades mecânicas de cada animal estão apresentados no ANEXO C.

3.2.1 Rigidez

O valor médio da rigidez obtido dos ensaios de flexo-compressão realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo Cont I foi $(209,37 \pm 64,46) \times 10^3 \text{ N/m}$, o valor médio do grupo S foi $(189,81 \pm 66,26) \times 10^3 \text{ N/m}$, do grupo Cont II foi $(287,17 \pm 77,15) \times 10^3 \text{ N/m}$, do grupo S-L foi $(269,13 \pm 46,68) \times 10^3 \text{ N/m}$ e do grupo S-T $(275,32 \pm 62,73) \times 10^3 \text{ N/m}$ (Figura 45).

Figura 45 – Valores médios da rigidez obtidos dos ensaios de flexo-compressão realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais, nos vários grupos.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparações estatísticas da rigidez entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	0,020	significativo
Cont I x S	Teste t	0,512	não significativo
Cont II x S-L x S-T	One Way ANOVA	0,811	não significativo

3.2.2 Força máxima

O valor médio da força máxima obtido dos ensaios de flexo-compressão realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais do grupo Cont I foi $(101,46 \pm 10,53)$ N, o valor médio do grupo S foi $(86,32 \pm 13,47)$ N, do grupo Cont II foi $(115,05 \pm 12,57)$ N, do grupo S-L foi $(104,93 \pm 12,94)$ N e do grupo S-T $(115,44 \pm 15,54)$ N (Figura 46).

Figura 46 – Valores médios da força máxima obtidos dos ensaios de flexo-compressão realizados na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais, nos vários grupos.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparações estatísticas da força máxima entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	0,013	significativo
Cont I x S	Teste t	0,012	significativo
Cont II x S-L x S-T	One Way ANOVA	0,183	não significativo

3.2.3 Resultados radiográficos

O padrão de fratura foi semelhante em todos os grupos e basicamente constituído por um traço que se iniciou na região do topo da cabeça femoral e seguiu verticalizada no sentido do colo femoral.

Em algumas radiografias, o traço foi bem visível e acompanhado de um pequeno desvio dos fragmentos. Em outras, ele era pouco visível, mas em nenhum caso houve separação completa dos fragmentos (Figura 47).

Figura 47 – Detalhes de algumas radiografias obtidas após o ensaio de flexo-compressão no terço proximal dos fêmures esquerdos de diferentes grupos, mostrando as fraturas (Setas).

3.3 Propriedades mecânicas dos corpos de prova do fêmur direito

Dos ensaios mecânicos realizados no corpo de prova de osso cortical da diáfise do fêmur direito das ratas foram obtidos gráficos tensão x deflexão (flecha) (Figura 48, Figura 49, Figura 50, Figura 51 e Figura 52). A Tabela 5 apresenta os valores médios da tensão máxima e do módulo de elasticidade de todos os grupos experimentais.

Figura 48 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo Cont I (controle I).

Figura 49 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo S (suspensão).

Figura 50 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo Cont II (controle II).

Figura 51 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo S-L (suspenso-liberado).

Figura 52 – Gráficos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos dos animais do grupo S-T (suspenso-treinado).

Tabela 5 – Valores médios das propriedades mecânicas obtidos dos ensaios realizados nos corpos de prova dos fêmures direitos das ratas.

Propriedade mecânica			Grupos				
			Cont I	S	Cont II	S-L	S-T
Limite de proporcionalidade	Tensão (MPa)	Média	147,49	133,64	149,42	147,36	154,53
		Desv. Pad.	23,34	20,47	19,05	27,01	21,06
	Deflexão (x10 ⁻³ m)	Média	0,212	0,209	0,182	0,186	0,186
		Desv. Pad.	0,031	0,027	0,023	0,026	0,018
Módulo de elasticidade (GPa)		Média	8,69	8,45	9,76	9,71	11,25
		Desv. Pad.	1,26	2,47	1,66	1,85	1,16
Tensão máxima (MPa)		Média	152,90	162,64	199,62	176,73	201,41
		Desv. Pad.	21,98	35,51	19,82	43,29	27,96
Módulo de tenacidade (x10 ³ MPa.m)		Média	18,65	27,02	34,96	22,85	45,66
		Desv. Pad.	6,00	10,59	10,18	9,73	18,14

Estes resultados foram analisados estatisticamente e estão ilustrados em gráficos apresentados a seguir. E, os valores das propriedades mecânica de cada animal estão apresentados no ANEXO D.

3.3.1 Limite de proporcionalidade

O valor médio da tensão no limite de proporcionalidade obtido dos animais do grupo Cont I foi $(147,49 \pm 23,34)$ MPa, o valor médio do grupo S foi $(133,64 \pm 20,47)$ MPa, do grupo Cont II foi $(149,42 \pm 19,05)$ MPa, do grupo S-L foi $(147,36 \pm 27,01)$ MPa e do grupo S-T $(154,53 \pm 21,06)$ MPa (Figura 53).

Figura 53 – Comparação entre os valores médios da tensão no limite de proporcionalidade dos CDP de osso cortical obtidos do fêmur direito, nos vários grupos.

Os resultados das comparações estatísticas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparações estatísticas da tensão no limite de proporcionalidade entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	0,833	não significativo
Cont I x S	Teste t	0,175	não significativo
Cont II x S-L x S-T	One Way ANOVA	0,766	não significativo

O valor médio da deflexão no limite de proporcionalidade obtido dos animais do grupo Cont I foi $(0,212 \pm 0,031) \times 10^{-3} \text{m}$, o valor médio do grupo S foi $(0,209 \pm 0,027) \times 10^{-3} \text{m}$, do grupo Cont II foi $(0,182 \pm 0,023) \times 10^{-3} \text{m}$, do grupo S-L foi $(0,186 \pm 0,026) \times 10^{-3} \text{m}$ e do grupo S-T $(0,186 \pm 0,018) \times 10^{-3} \text{m}$ (Figura 54).

Figura 54 – Comparação entre os valores médios da deflexão no limite de proporcionalidade dos CDP de osso cortical obtidos do fêmur direito, nos diferentes grupos.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparações estatísticas da deflexão no limite de proporcionalidade entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	0,016	significativo
Cont I x S	Teste t	0,825	não significativo
Cont II x S-L x S-T	One Way ANOVA	0,891	não significativo

3.3.2 Módulo de elasticidade

O valor médio do módulo de elasticidade obtido dos ensaios de flexão realizados no corpo de prova do fêmur direito dos animais do grupo Cont I foi $(8,69 \pm 1,26)$ GPa, o valor médio do grupo S foi $(8,45 \pm 2,47)$ GPa, do grupo Cont II foi $(9,76 \pm 1,66)$ GPa, do grupo S-L foi $(9,71 \pm 1,85)$ GPa e do grupo S-T $(11,25 \pm 1,16)$ GPa (Figura 55).

Figura 55 – Valores médios do módulo de elasticidade obtidos dos ensaios de flexão realizados nos corpos de prova do fêmur direito dos animais, nos diferentes grupos.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparações estatísticas do módulo de elasticidade entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	0,108	não significativo
Cont I x S	Teste t	0,795	não significativo
Cont II x S-L x S-T	One Way ANOVA	0,062	não significativo

3.3.3 Tensão máxima

O valor médio da tensão máxima obtido dos ensaios de flexão realizados no corpo de prova do fêmur direito dos animais do grupo Cont I foi $(152,90 \pm 21,98)$ MPa, o valor médio do grupo S foi $(162,64 \pm 35,51)$ MPa e do grupo Cont II foi $(199,62 \pm 19,82)$ MPa. A mediana dos grupos Cont II, S-L e S-T foram $(201,48)$ MPa, $(173,56)$ MPa e $(208,73)$ MPa, respectivamente (Figura 56).

Figura 56 – Valores médios da tensão máxima obtidos dos ensaios de flexão realizados nos corpos de prova do fêmur direito dos animais, nos diferentes grupos.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparações estatísticas da tensão máxima entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	<0,001	significativo
Cont I x S	Teste t	0,471	não significativo
Cont II x S-L x S-T*	Kruskal-Wallis One Way ANOVA	0,361	não significativo

* Não passaram no teste de igualdade de variância.

3.3.4 Módulo de tenacidade

O valor médio do módulo de tenacidade obtido dos ensaios de flexão realizados no corpo de prova do fêmur direito dos animais do grupo Cont I foi $(18,65 \pm 6,00) \times 10^3 \text{MPa.m}$, o valor médio do grupo S foi $(27,02 \pm 10,59) \times 10^3 \text{MPa.m}$, do grupo Cont II foi $(34,96 \pm 10,18) \times 10^3 \text{MPa.m}$, do grupo S-L foi $(22,85 \pm 9,73) \times 10^3 \text{MPa.m}$ e do grupo S-T $(45,66 \pm 18,14) \times 10^3 \text{MPa.m}$ (Figura 57).

Figura 57 – Valores médios do módulo de tenacidade obtidos dos ensaios de flexão realizados nos corpos de prova do fêmur direito dos animais, nos diferentes grupos.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Comparações estatísticas do módulo de tenacidade entre os grupos.

Comparações	Teste estatístico	p	Interpretação
Cont I x Cont II	Teste t	<0,001	significativo
Cont I x S	Teste t	0,043	significativo
Cont II x S-L x S-T	One Way ANOVA	0,003	significativo
Cont II x S-L	Tukey	0,111	não significativo
Cont II x S-T		0,159	não significativo
S-L x S-T		0,002	significativo

3.4 Análise microscópica

3.4.1 Grupos Cont I e Cont II (controles)

Não foram observadas diferenças entre os dois grupos controle (Cont I e Cont II), tanto para os cortes transversais das diáfises dos fêmures esquerdos como para os cortes no plano frontal da região proximal dos fêmures direitos.

3.4.1.1 Diáfise femoral

Foi observado um anel estreito e bem delimitado de fluorescência na superfície externa da córtex, correspondendo à neoformação óssea periosteal. Este anel não era contínuo e ficava mais nítido em algumas regiões, de acordo com a peça examinada. Outro anel também foi observado na superfície do canal medular, com as mesmas características, correspondendo à neoformação óssea endosteal (Figura 58).

Figura 58 – Corte transversal da diáfise do fêmur de um animal do grupo Controle I. Detalhe para a neoformação óssea periosteal e endosteal, caracterizada pelos anéis fluorescentes. (barra = 1mm).

No interior da córtex, as áreas de fluorescência acompanhavam o trajeto dos vasos intra-ósseos, indo de uma face à outra do osso, correspondendo ao sistema vascular de Volkmann (Figura 59). As lacunas osteocíticas apareciam com uma fraca fluorescência inespecífica.

Figura 59 – Sistema vascular intra-ósseo (canais de Volkmann) no interior da córtex do fêmur de um animal do grupo Controle II. (barra = 1mm).

As lamelas ósseas distribuíam-se em três camadas que eram mais nítidas em algumas regiões. Uma, a mais externa, as lamelas apresentavam disposição paralela à superfície cortical. Uma camada intermediária apresentava lamelas com disposição irregular ou ao redor dos canais de Havers e, uma última camada mais interna, também com disposição das lamelas paralelas à primeira camada (Figura 60).

Figura 60 – Lamelas ósseas distribuídas em três camadas. Na mais externa (1), as lamelas apresentavam disposição paralela à superfície cortical, na camada intermediária (2) as lamelas estavam dispostas irregularmente ou ao redor dos canais de Havers (setas) e na camada mais interna (3), as lamelas também apresentavam disposição paralela à semelhança da primeira camada. (barra = 1mm).

3.4.1.2 Cabeça femoral

A cabeça do fêmur dos animais dos grupos controle apresentava formato esférico e delimitação precisa. Apresentava no interior o núcleo de ossificação secundário com trabeculado do tipo esponjoso que exibia fluorescência na superfície externa das trabéculas (Figura 61).

Figura 61 – Cabeça femoral observada por meio de fluorescência de um animal do grupo Controle I. A placa de crescimento foi visível (setas) e o núcleo de ossificação apresentou trabeculado tipo esponjoso (*). (barra = 1mm)

Foi possível identificar o osso subcondral, pela disposição típica das lacunas osteocíticas (Figura 62).

Figura 62 – Osso subcondral (*) e cartilagem (seta) da cabeça femoral dos animais dos grupos controles. (barra = 1mm)

Na região da placa de crescimento foi visível uma faixa de fluorescência adjacente com disposição paralela do trabeculado (Figura 63).

Figura 63 – Placa de crescimento com uma faixa de fluorescência adjacente com disposição paralela do trabeculado na cabeça femoral dos animais dos grupos controles. (barra = 1mm)

3.4.2 Grupo S (*suspenso*)

Não foram observadas diferenças em relação aos grupos controle para a cabeça femoral. Para a diáfise femoral, a única diferença foi a diminuição de fluorescência na superfície externa da córtex, ou seja, com menor formação periosteal (Figura 64).

Figura 64 – Corte transversal da diáfise do fêmur de um animal do grupo S (*suspenso*). Detalhe para a menor fluorescência na superfície externa. (barra = 1mm).

3.4.3 Grupo S-L (*suspenso e liberado*)

3.4.3.1 *Diáfise femoral*

A lâmina fluorescente subperiosteal apresentava-se mais irregular e com aspecto serrilhado (comparado com os grupos controle). Já, a lâmina endosteal apresentava-se mais longa e mais nítida e, às vezes, com formação óssea maior e mais localizada (Figura 65).

3.4.3.2 Cabeça femoral

As principais alterações foram encontradas na epífise femoral, caracterizadas pela perda da esfericidade e adquirindo um aspecto achatado, com diminuição da altura do núcleo de ossificação. Os espaços intertrabeculares do núcleo de ossificação diminuíram e, em alguns casos, desapareceram. Também, foi observado que ocorreu uma desorganização do padrão trabecular na mesma região.

Praticamente, em todos os cortes, a porção medial do núcleo de ossificação foi a mais afetada, não apresentando trabeculado ósseo (Figura 66).

Figura 66 – Corte no plano frontal da região proximal do fêmur de um animal do grupo S-L (suspensão-liberado). Detalhes para a perda da esfericidade e diminuição do tamanho do núcleo de ossificação. (Barra = 1mm).

A placa de crescimento apresentou irregularidades de contorno e regiões de alargamento. Na região lateral a placa desapareceu, unindo as trabéculas do osso

metafisário com as do osso epifisário (Figura 67). O contorno da cartilagem articular estava mal definido e o osso subcondral perdeu a organização típica (Figura 68).

Figura 67 – Irregularidades da placa de crescimento da cabeça femoral dos animais do grupo S-L (suspensão-liberado). Alargamento (*) e descontinuidade (círculo). (barra = 1mm).

Figura 68 – Desorganização do osso subcondral (*) da cabeça femoral dos animais do grupo S-L (suspensão-liberado). (barra = 1mm).

3.4.4 Grupo S-T (*suspenso e treinado*)

3.4.4.1 *Diáfise femoral*

Não foram observadas diferenças em relação aos grupos controle.

3.4.4.2 *Cabeça femoral*

Foram preservados todos os aspectos do núcleo de ossificação, como o formato esférico da cabeça femoral, a altura e a distribuição do trabeculado.

A placa de crescimento estava bem individualizada, embora, tenha desaparecida na porção lateral da cabeça femoral. Em apenas dois animais isto não ocorreu (Figura 69).

Figura 69 – Corte no plano frontal da região proximal do fêmur de um animal do grupo S-T (*suspenso-treinado*). Detalhe para a preservação da esfericidade e do trabeculado no núcleo de ossificação. Outro detalhe é a interrupção da placa de crescimento na região lateral (seta). (barra = 1mm).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Durante os vôos espaciais que duram mais de um mês, os astronautas sofrem perdas significativas da massa óssea e da densidade mineral óssea nas principais partes do esqueleto que suportam o peso corporal, principalmente na coluna vertebral e nos membros inferiores (TURNER, 2000). Estudos mostraram que estas perdas são conseqüências do sub-carregamento do peso observado no ambiente de microgravidade (HOLICK, 1998; VICO; LAFAGE-PROUST; ALEXANDRE, 1998). O problema da perda de massa óssea, neste caso, ainda não é quantitativamente confiável ou compreendido, devido ao número relativamente pequeno de humanos que foram ao espaço, à duração limitada das missões e às imprecisões das técnicas de medidas (SCHAFFNER, 2006).

O decréscimo da massa óssea pode provocar aumento no risco de fraturas, não durante o período de sub-carregamento, mas no retorno às atividades físicas normais. Portanto, é fundamental conhecer o comportamento mecânico das principais estruturas esqueléticas, responsáveis pela sustentação do peso corporal, após o período de hipocinesia.

Um dos objetivos desta pesquisa surgiu do interesse em analisar mecanicamente e microscopicamente os fêmures de ratos submetidos à hipocinesia e posterior treinamento em esteira. Outro objetivo surgiu da necessidade de desenvolver metodologias mais precisas de análises mecânicas em fêmures de ratos.

Escolhemos o rato como animal experimental pela facilidade de mantê-lo em laboratório, pelo baixo custo e, principalmente pela possibilidade de simular o sub-carregamento.

De acordo com Morey-Holton e Globus (1998) o modelo de suspensão pela cauda provoca um mínimo de estresse no animal. Portanto, todos os procedimentos utilizados para suspensão dos animais foram baseados no trabalho de Silva e Volpon (2004), que realizaram um estudo para avaliar um modelo de suspensão pela cauda, que preservasse a saúde do animal e que permitisse livre movimentação dos membros posteriores, porém sem apoio. Neste trabalho, os autores concluíram que o sistema desenvolvido foi satisfatório com relação à integridade do animal e também, com relação às alterações mecânicas das estruturas ósseas do membro posterior.

A suspensão por 28 dias foi baseada em trabalhos realizados com animais suspensos pelo mesmo período. Nestes casos, o tempo foi suficiente para causar alterações significativas na estrutura óssea (SHAW et al., 1987; Van der MEULEN; MOREY-HOLTON; CARTER, 1995; COLLERAN, et al., 2000; GARBER; McDOWELL; HUTTON, 2000; PORNPRASERTSUK et al., 2001; BLOOMFIELD et al., 2002).

O sistema de fixação da cauda para a suspensão foi de fácil execução, mas alguns animais tiveram a cauda fraturada antes de completar o período de 28 dias de suspensão. Não foi possível descobrir a causa deste problema, pois todos passaram pelos mesmos procedimentos de fixação. Provavelmente a cauda fraturou porque alguns animais ficaram mais agitados e, conseqüentemente, os danos foram maiores.

A necrose da extremidade da cauda durante a suspensão foi descrita em alguns trabalhos (NORMAN et al., 2000; SILVA; VOLPON, 2004; LARA, 2003), portanto, como medida preventiva foi realizada a amputação.

A cauda foi totalmente amputada após a suspensão, devido às lesões graves causadas pelo sistema de fixação da cauda. Morey-Holton e Globus (2002) e mais recentemente Knox et al. (2004) apresentaram diferentes sistemas de fixação da cauda para suspensão do rato, todos com o objetivo de minimizar o atrito da cauda com as faixas. Portanto, danos na cauda do animal ainda são problemas constantes, mas poucos trabalhos relataram este problema. Para os próximos estudos, seria importante testar os novos sistemas de fixação, na tentativa de evitar danos à cauda.

Não houve problema algum aparente causado pela amputação da cauda dos animais, mesmo durante o treinamento na esteira.

O treinamento em esteira é um exercício físico muito estudado para a recuperação estrutural do sistema músculo-esquelético (BARENGOLTS et al., 1993; Van der WIEL et al., 1995; KANEPS; STOVER; LANE, 1997; NORMAN et al., 2000). Este tipo de treinamento apresenta vantagens como: facilidade na execução, boa adaptação dos animais aos exercícios e os resultados são satisfatórios.

Existem vários estudos com diferentes protocolos de exercício em esteira, mas foi seguido o protocolo utilizado por Norman et al. (2000), porque estes autores treinaram ratos em esteira após ficarem suspensos pela cauda por 21 dias. E, segundo os mesmos autores, o dia de descanso dos animais foi importante para recuperação e evitar danos relacionados ao excesso de treinamento.

Durante o treinamento, alguns animais não se adaptaram ao exercício em esteira e foram descartados. Não foi possível identificar os motivos da não adaptação destes animais aos treinamentos. Mas, em outros trabalhos com esteira,

poderá ser feita uma seleção prévia e com isso evitar a perda de animais, principalmente após a realização de outros procedimentos.

A massa corporal dos animais diminuiu significativamente após 28 dias de suspensão, o mesmo foi relatado por outros trabalhos (ALLEN; BLOOMFIELD, 2003; BLOOMFIELD et al., 2002; NORMAN et al., 2000).

Após 21 dias de liberação os animais recuperaram a massa corporal e, com o protocolo de treinamento utilizado, os animais aumentaram significativamente a massa. No trabalho de NORMAN et al. (2000), o treinamento apenas promoveu a recuperação da massa corporal. Esta diferença provavelmente foi devido ao fato dos tempos de suspensão serem diferentes.

4.1 Análises mecânicas

Os ensaios mecânicos em ossos podem ser realizados em ossos inteiros ou em corpos de prova. Devido à não homogeneidade, um ensaio mecânico realizado em um corpo de prova de osso indica as propriedades da região do osso de onde foi retirada a amostra. Já, o ensaio realizado em um osso inteiro (por exemplo um fêmur) pode determinar o comportamento mecânico da estrutura, pois preserva sua forma.

A utilização da mesma velocidade de aplicação da força, nos dois ensaios realizados neste trabalho, foi importante porque o comportamento mecânico dos ossos varia de acordo com a velocidade (propriedade de viscoelasticidade). Portanto, foi uma forma de padronização.

Os ensaios foram realizados no mesmo dia em que foram descongelados e obtidos os corpos de provas, pois, ainda não se sabe o que ocorre com o comportamento mecânico dos ossos de ratos após sucessivos congelamentos e descongelamentos.

4.1.1 Terço proximal dos fêmures

O quadril é uma articulação muito importante e está envolvido diretamente nos problemas relacionados à osteoporose, pois, é um dos locais com maior índice de fraturas em humanos (SHEN; WRONSKI, 1997).

O método convencional para testar mecanicamente o terço proximal do fêmur de ratos é baseado na aplicação de uma força axial na cabeça do fêmur. Entretanto, em ossos osteoporóticos, a maioria das fraturas neste local é resultante de momentos fletores elevados, gerados por forças laterais ou forças torcionais (ZHANG et al., 2005).

Neste trabalho foi escolhido o método convencional por não necessitar de acessórios especiais, pelos resultados satisfatórios e também, por apresentar a metodologia de ensaio bem definida.

O maior problema observado neste ensaio foi no alinhamento dos fêmures durante a inclusão. Mas, em trabalhos que utilizaram o mesmo tipo de ensaio (TUUKKANEN; PENG; VÄÄNÄNEN, 1994; Van der WIEL et al., 1995; NORMAN et al., 2000; BLOOMFIELD et al., 2002; ZHANG et al., 2005), os autores não descreveram como realizaram o alinhamento do fêmur.

Macroscopicamente, após a realização dos ensaios foi observado o esmagamento da cabeça femoral no local da aplicação da força, confirmando o que foi descrito por Bloomfield et al. (2002). Portanto, de acordo com estes autores, a propriedade mecânica que melhor representou o comportamento da região ensaiada foi a força máxima.

Comparando o grupo Cont I com o grupo Cont II, foram verificadas diferenças significativas na rigidez e na força máxima. Pôde-se concluir que os animais com 118 dias idade não estavam com sua estrutura óssea estabilizada, ou seja, eles não estavam totalmente maduros. Portanto, não foram realizadas comparações entre o grupo S (118 dias de idade) e os grupos S-L (139 dias de idade) e S-T (139 dias de idade).

A escolha da idade dos animais foi baseada em outros trabalhos com a mesma raça de rato utilizado neste trabalho (SILVA; VOLPON, 2004; LARA, 2003). Mas, o único controle destes trabalhos, foi o peso do animal e, na idade de 90 dias os animais estavam no peso.

Ao comparar o grupo Cont I com o grupo S, foi observada diminuição significativa da força máxima. Demonstrando que a suspensão por 28 dias provocou alterações estruturais. Esta diminuição também foi encontrada por Bloomfield et al. (2002).

Na comparação das propriedades analisadas não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos Cont II, S-L e S-T. Portanto, a simples liberação (grupo S-L) promoveu a recuperação da força máxima da mesma forma que o treinamento.

Outras propriedades mecânicas como o momento fletor e o limite de proporcionalidade não foram analisadas porque no cálculo do momento fletor,

existente neste tipo de ensaio, não foi possível a determinação da distância entre o ponto de aplicação da força e o eixo longitudinal do fêmur. Para isso, seria necessária a criação de uma metodologia confiável para a determinação desta distância. Já, o limite de proporcionalidade não foi determinado devido à dificuldade na padronização do método de obtenção da localização deste ponto, visto que nos gráficos obtidos a região elástica não foi totalmente linear.

Analisando macroscopicamente a estrutura do fêmur do rato, existe o terceiro trocanter que é uma protuberância na face lateral que, provavelmente, causa fortalecimento estrutural maior do que nos fêmures dos humanos. Portanto, deve-se tomar cuidado na extrapolação dos resultados. Segundo Chiasson (1994) o músculo glúteo superficial incorpora os músculos tensor da fáscia lata, sartório e glúteo máximo, e se origina na borda dorsal do ílio e tem a inserção no fêmur perto do trocanter maior e fáscia lata. Esse músculo se apresenta em forma de leque justificando a protuberância na face lateral do terço proximal dos fêmures de ratos.

Outro ponto a ser comentado é que, neste caso, a estrutura ensaiada é formada por osso cortical preenchido com osso trabecular, ou seja, não é homogênea, o que dificulta a interpretação dos resultados. Além disso, nesta parte do fêmur o formato é muito complexo e causa distribuição irregular das forças.

Nas radiografias não foi observada diferença alguma nos padrões de fraturas, provavelmente porque as alterações provocadas pela suspensão, suspensão-liberação e suspensão-treinamento não foram suficientes para alterar o padrão de fratura. Mas, a aplicação de uma força diferente (lateral ou torcional) poderia gerar outros tipos de fraturas e até um comportamento mecânico diferente.

A radiografia tirada antes dos ensaios também possibilitaria a determinação da distância do ponto de aplicação da carga até o eixo da linha neutra necessária

para a determinação do momento fletor, além do controle do alinhamento do fêmur durante o ensaio.

4.1.2 Osso cortical da diáfise anterior dos fêmures

Vários autores estudaram o comportamento mecânico do osso cortical a partir de corpos de provas de ossos de bovinos (MARTIN; BOARDMAN, 1993; BRANDÃO, 1997), de humanos (REILLY; BURSTEIN, 1975; CARTER; SPENGLER, 1978) e de outros animais (CURREY, 1990). Mas não encontramos trabalhos realizados em corpos de provas de osso cortical de animais de pequeno porte, como ratos e coelhos.

As propriedades mecânicas do tecido ósseo do rato são determinadas por meio de ensaios em ossos inteiros, como o fêmur e a tíbia e, na maioria das vezes são submetidos a ensaios de flexão em três pontos. Estes ensaios focalizam a região diafisária dos ossos, que é composta principalmente por osso cortical (MOREY-HOLTON; GLOBUS, 1998; VADJA; BOWMAN; MILLER, 2001). Mas, os resultados podem ser influenciados pela variação da área transversal do osso de um animal para outro e mesmo ao longo do seu comprimento.

A utilização do ensaio de flexão é muito comum, principalmente quando o osso for muito pequeno para ensaios de tração ou compressão. Os maiores problemas observados nos ensaios de flexão são para manter o alinhamento do corpo de prova, o atrito nos pontos de aplicação da força, a imprecisão das medidas do deslocamento, as diferenças da secção transversal ao longo do eixo longitudinal e a presença de deformação elástico-plástico. Esta deformação ocorre quando o

limite elástico é excedido para as fibras mais externas dos corpos de provas (ASHMAN, 1989). Mas estes problemas podem ser solucionados ou pelo menos minimizados os seus efeitos, com cuidados ao posicionar o corpo de prova no acessório, com arredondamento dos pontos de aplicação da força e pontos de apoio e, melhoraria dos métodos de obtenção dos corpos de provas.

As principais vantagens do ensaio de flexão em três pontos é a simplicidade dos acessórios para realização dos ensaios, e os corpos de provas não precisam ter formas especiais além de apresentar bons resultados.

A determinação de retirar o corpo de prova da região anterior da diáfise do fêmur foi devido à sua melhor linearidade ao longo do comprimento do fêmur, o que facilitou na obtenção da amostra. Outro motivo foi que este local é uma região submetida ao mesmo tipo de tensão aplicado no ensaio (flexão), durante uma atividade física normal.

Em uma das fases da metodologia de obtenção do corpo de prova foram utilizados discos serrilhados para ajudar na refrigeração no material durante o corte, pois, o aquecimento elevado pode danificar a estrutura, causando variações no comportamento mecânico (COWIN, 1989).

Na presente investigação foram determinadas propriedades elásticas (limite de proporcionalidade e módulo de elasticidade) e plásticas (tensão máxima e módulo de tenacidade). Estas propriedades foram intrínsecas, ou seja, independeram da forma e das dimensões. Portanto, as alterações observadas foram referentes ao tecido e não à estrutura.

Do mesmo modo que no ensaio do terço proximal do fêmur, algumas propriedades mecânicas (tensão máxima, deflexão do limite de proporcionalidade e módulo de tenacidade) obtidas do ensaio no corpo de prova do grupo Cont I, foram

significativamente diferentes do grupo Cont II. Portanto, também não foram realizadas comparações entre o grupo S (suspenso) com os grupos S-L (suspenso-liberado) e S-T (suspenso-treinado).

As propriedades mecânicas da fase elástica foram obtidas a partir dos pontos entre as tensões de 50MPa e 120MPa, pois, neste intervalo todas as curvas apresentaram uma grande linearidade e também estavam dentro da fase elástica. É importante salientar que em outros experimentos este intervalo pode ser diferente. Neste caso, basta uma observação visual de todos os gráficos e estipular o intervalo para as análises.

O limite de proporcionalidade foi determinado a partir de equações que possibilitaram a criação de uma forma padronizada de obtenção desta propriedade. É uma propriedade importante, pois, representa o ponto a partir do qual o material ou estrutura sofre deformações permanentes quando descarregado.

Os resultados apresentaram poucas diferenças entre os grupos, mas, analisando visualmente os gráficos obtidos, ficou nítida a diferença nos padrões das curvas dos diferentes grupos. Numericamente, a maior variação foi na fase plástica, mais especificamente no módulo de tenacidade, ou seja, na energia absorvida até a ruptura.

Segundo Rho, Kuhn-Spearing e Zioupos (1998) as propriedades mecânicas do osso cortical são influenciadas pela porosidade, nível de mineralização e pela organização da matriz sólida. E, de acordo com Bouvier (1989) o osso recém formado (osteóide), é 70% calcificado após poucos dias, chegando à máxima calcificação após vários meses, portanto, uma análise microradiográfica ou microtomográfica, poderia fornecer dados mais precisos sobre o estágio de calcificação que se encontravam os ossos.

A alta concentração de colágeno da fase orgânica confere ao osso resistência às tensões de tração. E, a fase inorgânica dá ao osso, resistência a tensões de compressão (BOUVIER, 1989). Extrapolando, pode-se dizer que a fase plástica observada nos gráficos pode estar relacionada com a quantidade de fibras de colágenos (fase orgânica) e, a fase inorgânica ao comportamento da fase elástica dos gráficos.

Portanto, pôde-se concluir dos resultados obtidos nesta análise que:

Cont I x Cont II – Ocorreram diferenças na fase elástica (deflexão do limite elástico) e na fase plástica (tensão máxima e módulo de tenacidade). Estas alterações confirmam os resultados do ensaio no terço proximal do fêmur, ou seja, os animais não estavam maduros.

Cont I x S (suspensão) – A suspensão provocou o aumento significativo da fase plástica (módulo de tenacidade). Provavelmente o que pode ter ocorrido é que a fase orgânica na matriz óssea dos animais do grupo S era maior. Mas, Allen e Bloomfield (2002) e Garber, McDowell e Hutton (2000) não encontraram diferença na densidade mineral óssea no osso cortical da região diafisária de fêmur de animais suspensos por 28 dias. Eles atribuíram estes achados à pequena influência que a suspensão induz na composição mineral de ossos corticais.

Cont II x S-L x S-T – A ausência de fase plástica no grupo S-L sugere que toda matriz colágena do tecido ósseo cortical estudado, estava calcificada. E o treinamento após a suspensão promoveu a recuperação das propriedades plásticas, ou seja, o treinamento pode ter estimulado a formação óssea (osteogênese).

Outro raciocínio, é que materiais mais duros apresentam módulo de tenacidade menor, quando submetidos a ensaios de flexão (SOUZA, 1982). Mas o ensaio de dureza em osso é muito complexo, necessitando de equipamentos

específicos. Portanto, fica como sugestão desenvolver metodologias para realização deste tipo de ensaio.

Apesar dos resultados satisfatórios, o desvio padrão foi muito alto em algumas propriedades, o que pode ter dificultado as análises estatísticas. Para diminuir o desvio padrão seria preciso aumentar o número de animais nos grupos.

As propriedades mecânicas calculadas com esta metodologia foram mais precisas, pois, representaram o comportamento mecânico do material e não da estrutura inteira.

Não foi encontrado trabalho algum sobre o estudo do comportamento mecânico de corpos de provas de osso cortical obtidos de fêmures de ratos, portanto, não foi possível comparar os resultados obtidos com outros autores. E, a metodologia utilizada para obtenção dos CDP de fêmur de ratos e para os cálculos das propriedades mecânicas poderá ser extrapolada para outros animais de pequeno porte, como o coelho.

4.2 Análise microscópica

A aplicação do marcador ósseo (tetraciclina) foi realizada com o objetivo de verificar os locais em processo de calcificação, portanto, uma única aplicação foi o suficiente.

Não foram realizadas análises quantitativas nas lâminas porque a espessura dos cortes deveria ter no máximo trinta micrômetros. Durante o processo de lixamento das peças, as trabéculas começaram a quebrar quando ficavam abaixo dos cem micrômetros, tornando impossível a obtenção de cortes naquelas

dimensões. Isto ocorreu porque a resina não penetrou totalmente na malha trabecular. Mas, para a análise qualitativa o método utilizado foi satisfatório.

A maior vantagem dos processos realizados neste trabalho foi a utilização de materiais de baixo custo e de fácil aquisição. Outro ponto interessante foi a possibilidade de realizar o processamento dos materiais e análise das lâminas, apenas com os recursos disponíveis no laboratório.

As maiores alterações na cabeça femoral foram observadas no grupo S-L (suspensão-liberado). Neste caso, pode ter ocorrido o enfraquecimento das trabéculas ósseas e com o retorno às atividades normais, estas trabéculas sofreram fraturas, além de alterar a placa de crescimento (alargamento e descontinuidade). No núcleo de ossificação houve uma compactação das trabéculas e com isso, diminuição da área. Estas alterações provocaram deformações visíveis no formato esférico.

O alargamento da placa de crescimento, provavelmente foi causado pelo descolamento entre a placa epifisária e a camada proliferativa.

Nos animais do grupo suspensão-treinado a placa de crescimento ficou interrompida e desapareceu na porção lateral da cabeça femoral. Provavelmente a placa sofreu algum tipo de lesão após a liberação, mas o aumento gradual da intensidade do treinamento preservou o formato esférico da cabeça femoral, mas não impediu as alterações na placa de crescimento.

As alterações no formato da cabeça e na estrutura trabecular, podem ser os motivos pelos quais não foram encontradas diferenças nas propriedades mecânicas obtidas do ensaio no terço proximal do fêmur esquerdo, na comparação entre os grupos Cont II, S-L e S-T. Ou seja, a estrutura se adaptou ao retorno às atividades.

Comparando o grupo Cont I com o grupo S (suspensão) não foi observada diferença alguma, apesar da diferença encontrada no ensaio mecânico (força máxima).

Na diáfise do fêmur dos animais dos grupos Cont I e Cont II, foram observados anéis fluorescentes tanto na região periosteal, como na região endosteal, caracterizando a neoformação óssea nestas regiões. Em alguns locais era mais nítida a fluorescência, ou seja, a atividade óssea foi maior, talvez estimulada pela atividade muscular e pelas tensões causadas pelas forças de reação do solo.

A inibição da formação periosteal foi observada por Wronski e Morey (1983) em ratos que permaneceram no espaço por 18,5 dias. Van der Meulen, Morey-Holton e Carter (1995) descreveram que a área transversal da diáfise do fêmur diminuiu significativamente em ratos suspensos pela cauda. Esta diminuição foi confirmada por Norman *et al.* (2000), Garber, McDowell e Hutton (2000), Allen e Bloomfield (2002) e Bloomfield *et al.* (2002). Todos atribuíram a diminuição da área transversal à interrupção da formação periosteal.

Nos animais do grupo S (suspensão) foram observados alguns locais de fluorescências apenas no endóstio, ou seja, não houve formação óssea periosteal. Portanto, as observações estão de acordo com a literatura.

Já, nos animais do grupo S-L (suspensão-liberado) a formação endosteal estava mais acentuada, provavelmente porque o osso ainda estava em fase de recuperação e, no grupo S-T (suspensão-treinado) o osso já estava restaurado, pois estava semelhante ao grupo controle, ou seja, promoveu o balanço osteogênico.

4.3 Considerações finais

Um fator importante a ser considerado nos trabalhos com experimentação animal são as alterações dos processos fisiológicos do osso normal (além das mudanças pretendidas pelos pesquisadores) que amplificam ou atenuam a resposta ao remodelamento.

Segundo Ding et al. (1997), grandes variações nos valores das propriedades mecânicas, em trabalhos de diferentes pesquisadores, podem ser resultados de diferentes protocolos de preparação dos materiais, como a utilização de ossos frescos congelados ou secos e desengordurados (LINDAHL, 1976; CARTER; HAYES, 1977), armazenados ou congelados (PANJABI; WHITE; SOUTHWICK, 1973; LINDE; SORENSEN, 1993), geometria do corpo de prova (CARTER; HAYES, 1977; LINDE; HVID; MADSEN, 1992), temperatura (LINDE, 1994) e a direção do carregamento (DELIGIANNI; MARIS; MISSIRLIS, 1994). Portanto, torna-se difícil a comparação de valores com outros trabalhos, daí, a importância de padronizações nos métodos de análises.

As diferenças das propriedades mecânicas entre o grupo Cont I e o grupo Cont II sugerem, de acordo com os trabalhos de Burstein, Reilly e Martens (1976), Carter e Spengler (1978), Vogel (1979) e de Keller, Spengler e Carter (1986), que existam diferenças na composição microestrutural dos ossos de animais de diferentes faixas etárias. Portanto, não foi possível fazer nenhuma comparação entre o grupo S (suspensão) com os grupos S-L (suspensão-liberado) e S-T (suspensão-treinado).

A região do terço proximal do rato sofreu maiores influências com a suspensão, provavelmente porque é uma região composta por osso trabecular.

Outra importante consideração é a comparação da resposta fisiológica do osso às variações das tensões, localização anatômica e as diferentes funções que os ossos desempenham dentro de um mesmo sistema esquelético.

Para os próximos trabalhos, a realização do controle radiográfico antes dos ensaios, possibilitaria identificar alterações geométricas que tenham ocorrido na região do terço proximal do fêmur (angulação do colo femoral e achatamento da cabeça femoral). Estas alterações poderão ocorrer como uma adaptação às diferentes cargas impostas durante o retorno às atividades normais (liberação) ou durante o treinamento. E, como principal sugestão para outro trabalho é a realização da mesma análise microscópica deste trabalho, em ossos de animais logo após o término da suspensão, pois, é neste momento que devem ocorrer as maiores alterações.

As contramedidas para evitar perdas de massa óssea incluem exercícios físicos, aumento da ingestão de cálcio, suplementação de vitamina D, exposição à luz ultravioleta e administração de alguns bifosfatados, porém, mostraram serem ineficientes durante vôos espaciais ou repouso prolongado no leito (SMITH; HEER, 2002). Provavelmente, tratamentos preventivos teriam melhores resultados, ou seja, preparar o organismo antes de submetê-lo a situações de sub-carregamento do peso corporal.

O desenvolvimento ou a descoberta de uma contramedida ideal aumentaria a segurança dos astronautas além de poder ajudar no tratamento dos problemas de perda de massa óssea observados aqui na Terra (SMITH; HEER, 2002).

Apesar de todos os estudos realizados, ainda não sabemos todos os mecanismos da perda de massa óssea causada pela hipocinesia. Portanto, outros estudos serão necessários para entendermos melhor a natureza da perda óssea.

As metodologias desenvolvidas neste trabalho criaram um aprofundamento e um refinamento nos estudos de ossos longos de animais de pequeno porte e, uma vez definidas e comprovadas que são válidas elas poderão ser aplicadas em outros trabalhos. Mas, fica evidente a necessidade de novos estudos com novos resultados que, somados aos obtidos neste trabalho, levarão à melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem nos tecidos ósseos, quando deixam de ser solicitados mecanicamente.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

1 – Na região do terço proximal do fêmur dos ratos, a suspensão pela cauda provocou diminuição das propriedades mecânicas, apesar de não apresentar diferença visível na análise microscópica. A liberação após a suspensão causou alterações no núcleo de ossificação, na esfericidade da cabeça e na placa de crescimento do terço proximal do fêmur, sem alterar o comportamento mecânico desta região. E o treinamento conservou o núcleo de ossificação e a esfericidade da cabeça após a suspensão, e também, não alterou o comportamento mecânico.

2 – No corpo de prova de osso cortical retirado da diáfise do fêmur de rato, a suspensão promoveu o aumento do módulo de tenacidade, e redução da ossificação periosteal. A liberação causou redução do módulo de tenacidade e a ossificação foi mais acentuada no endóstio. E com o treinamento, os ossos dos animais recuperaram o módulo de tenacidade e o balanço osteogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.R.; BLOOMFIELD, S.A. Hindlimb unloading has a greater effect on cortical compared with cancellous bone in mature female rats. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.94, p.642-650, 2003.

ANDREASSEN, T.T.; MELSEN, F.; OXLUND, H. The influence of growth hormone on cancellous and cortical bone of the vertebral body in aged rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.11, p.1094-1102, 1996.

ASHMAN, R.B. Experimental techniques. In: Cowin, S.C., **Bone Mechanics**. 1ª ed., Florida: CRC Press, 1989. cap.5, p.75-96.

ASTRAND, P.O.; RODAHL, K. **Tratado de fisiologia do exercício**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, p. 246-252, 1980.

BARENGOLTS, E.I.; CURRY, D.J.; BAPNA, M.S.; KUKREJA, S.C. Effects of two non-endurance exercise protocols on established bone loss in ovariectomized adult rats. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.52, p.239-243, 1993.

BIKLE, D.D.; SAKATA, T.; HALLORAN, B.P. The impact of skeletal unloading on bone formation. **Gravitational and Space Biology Bulletin**, Arlington, v.16, n.2, p.45-54, 2003.

BLOOMFIELD, S.A.; ALLEN, M.R.; HOGAN, H.A.; DELP, M.D. Site and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. **Bone**, New York, v.31, n.1, p.149-157, 2002.

BOUVIER, M. The biology and composition of bone. In: Cowin, S.C., **Bone Mechanics**, 1ª ed., Florida: CRC Press, 1989. cap.1, p.1-13.

BRANDÃO, J. **Módulo de elasticidade de ossos corticais: revisão e otimização da metodologia para ossos longos**. Ribeirão Preto, Dissertação (Mestrado) – Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997

BURGER, H.; De LAET, C.E.; Van DAELE, P.L.; WEEL, A.E.; WITTEMAN, J.C.; HOFMAN, A.; POLS, H.A. Risk factors for increased bone loss in an elderly population: the Rotterdam study. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.147, n.9, p.871-879, 1998.

BURSTEIN, A.H.; REILLY, D.T.; MARTENS, M. Aging of bone tissue: mechanical properties. **The Journal of Bone and Joint Surgery Am**, Boston, v.58-A, n.1, Jan., p.82-86, 1976.

BURSTEIN, A.H.; WRIGHT, T.M. **Fundamentals of orthopaedic biomechanics**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

CAIOZZO, V.J.; BAKER, R.E.; HERRICK, M.T.; BALDWIN, K.M. Effects of space-flight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.75, p.2466-2470, 1994.

CARTER, D.R.; HAYES, W.C. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. **The Journal of Bone and Joint Surgery Am**, Boston, v.59, n.7, p.954-962, 1977.

CARTER, D.R.; SPENGLER, D.M. Mechanical properties and composition of cortical bone, **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n.135, s.3, p.192-217, 1978.

CAVANAGH, P.R.; LICATA, A.A.; RICE, A.J. Exercise and pharmacological countermeasures for bone loss during long-duration space flight. **Gravitational and Space Biology Bulletin**, Arlington, v.18, n.2, p.39-58, 2005.

CHIASOON, R.B. The muscular system. In:_____ **Laboratory anatomy of the white rat**. 5.ed. St. Louis: WCB/McGraw-Hill, 1994. cap.3, p.18-51.

CHIAVERINI, V. **Tecnologia mecânica – Estrutura e propriedades: processos de fabricação**. v.I, McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1979.

COLLERAN, P.N.; WILKERSON, M.K.; BLOOMFIELD, S.A.; SUVA, L.J.; TURNER, R.T.; DELP, M.D. Alterations in skeletal perfusion with simulated microgravity: a possible mechanism for bone remodeling. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.89, p.1046-1054, 2000.

COWIN, S.C. The mechanical properties of cancellous bone tissue. In: _____. **Bone Mechanics**. 1^a ed., Florida: CRC Press, 1989. cap.7, p.129-158.

CURREY, J.D. Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.23, n.8, p.837-844, 1990.

DELLIGIANI, D.D.; MARIS, A.; MISSIRLIS, Y.F. Stress relaxation behavior of trabecular bone specimens. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.27, n.12, p.1469-1476, 1994.

DING, M.; DALSTRA, M.; DANIELSEN, C.C.; KABEL, J.; HVID, I.; LINDE, F. Age variations in the properties of human tibial trabecular bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery Br**, London, v.79-B, n.6, p.995-1002, 1997.

ENSRUD, K.E.; PALERMO, L.; BLACK, D.M.; CAULEY, J.; JERGAS, M.; ORWOLL, E.S.; NEVITT, M.C.; FOX, K.M.; CUMMINGS, S.R. Hip and calcaneal bone loss increase with advancing age: longitudinal results from the study of osteoporotic fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.10(11), p.1778-1787, 1995.

GARBER, M.A.; McDOWELL, D.L.; HUTTON, W.C. Bone loss during simulated weightlessness: a biomechanical and mineralization study in the rat model. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, Washington, v.71, n.6, p.586-592, 2000.

GREENSPAN, S.L.; MAITLAND-RAMSEY, L.; MYERS, E. Classification of osteoporosis in the elderly is dependent on site-specific analysis. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.58(6), p.409-414, 1996.

HAGIHARA, Y.; FUKUDA, S.; GOTO, S.; IIDA, H.; YAMAZAKI, M.; MORIYA, H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD?. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v.23, p.289-294, 2005.

HAM, A.W.; CORMACK, D.H. **Histologia**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1983.

HOGAN, H.A.; RUHMANN, S.P.; SAMPSON, H.W. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.15, n.2, p.284-292, 2000.

HOLICK, M.F. Perspective on the impact of weightlessness on calcium and bone metabolism. **Bone**, New York, v. 22, n. 5, p. 105-111, 1998.

HOU, J.C.-H.; SALEM, G.J.; ZERNICKE, R.F.; BARNARD, R.J. Structural and mechanical adaptations of immature trabecular bone to strenuous exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.69(4), p.1309-1314, 1990.

HUGHES-FULFORD, M. Altered cell function in microgravity. **Experimental Gerontology**, Oxford, v.26(2-3), p.247-256, 1991.

KANEPS, A.J.; STOVER, S.M.; LANE, N.E. Changes in canine cortical and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise. **Bone**, New York, v.21, n.5, 1997.

KASPER, C.E.; McNULTY, A.L.; OTTO, A.J.; THOMAS, D.P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: an empirical model. **Research in Nursing and Health**, New York, v.16, p.265-273, 1993.

KELLER, T.S.; SPENGLER, D.M.; CARTER, D.R. Geometric, elastic, and structural properties of maturing rat femora. **Journal of Orthopedic Research**, New York, v.4, p.57-67, 1986.

KNOX, M.; FLUCKEY, J.D.; BENNETT, P.; PETERSON, C.A.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. Hindlimb unloading in adult rats using an alternative tail harness design. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, Washington, v.75, n.8, 2004.

LARA, M.A.P., (2003). **Algumas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas submetidas a um modelo de hipoatividade e tratadas com exercício**. Ribeirão Preto, Dissertação (Mestrado) – Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, 2003.

LeBLANC, A.; SCHNEIDER, V.S. Can the adult skeleton recover lost bone? **Experimental Gerontology**, Oxford, v.26, p.189-201, 1991.

LeBLANC, A.D.; SCHNEIDER, V.S.; EVANS, H.J.; ENGELBRETON, D.A.; KREBS, J.M. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.5(8), p.843-850, 1990.

LINDAHL, O. Mechanical properties of dried defatted spongy bone. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Copenhagen, v.47, p.11-19, 1976.

LINDE, F. Elastic and viscoelastic properties of trabecular bone by a compression testing approach. **Danish Medical Bulletin**, Copenhagen, v.41, n.2, p.119-138, 1994.

LINDE, F.; HVID, I.; MADSEN, F. The effect of specimen geometry on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.25, p.359-368, 1992.

LINDE, F.; SORENSEN, H.C. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.26, p.1249-1252, 1993.

LOOKER, A.C.; JOHNSTON, C.C.; Jr WAHNER, H.W.; DUNN, W.L.; CALVO, M.S.; HARRIS, T.B.; HEYSE, S.P.; LINDSAY, R.L. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. women from NHANES III. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.10(5), p.796-802, 1995.

MARTIN R.B.; BOARDMAN, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties, **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.26, n.9, p.1047-1054, 1993.

MATHEY, J.; HORCAJADA-MOLTENI, M.-N.; CHANTERANNE, B.; PICHERIT, C.; PUEL, C.; LEBECQUE, P.; CUBIZOLES, C.; DAVICCO, M.-J.; COXAM, V.; BARLET, J.-P. Bone mass in obese diabetic Zucker rats: influence of treadmill running. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.70, p.305-311, 2002.

MATSUMOTO, T.; NAKAYAMA, K.; KODAMA, Y.; FUSE, H.; NAKAMURA, T.; FUKOMOTO, S. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. **Bone**, New York, v. 22, n. 5, p. 89-93, 1998.

MEADE, J.B. The adaption of bone to mechanical stress: experimentation and current concepts, In: Cowin, S.C., **Bone Mechanics**. 1ª ed., Florida: CRC Press, 1989. cap.10, p.211-252.

MOREY, E.R. Spaceflight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness. **BioScience**, Washington, v.29, n.3, p.168-172, 1979.

MOREY-HOLTON, E.R.; GLOBUS, R.K. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. **Bone**, New York, v. 22, n. 5, p. 83-88, 1998.

MOREY-HOLTON, E.R.; GLOBUS, R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.92, n.4, p.1367-1377, 2002.

NORDSLETTEN, L.; KAASTAD, T.S.; MADSEN, J.E.; REIKERÅS, O.; OVSTEBO, R.; STROMME, J.H.; FALCH, J. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.55, p.436-442, 1994.

NORMAN, T.L.; BRADLEY-POPOVICH, G.; CLOVIS, N.; CUTLIP, G.; BRYNER, R.W. Aerobic Exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, Washington, v.71, n.6, p.593-598, 2000.

PANJABI, M.M.; WHITE III, A.A.; SOUTHWICK, W.O. Mechanical properties of bone as a function of rate of deformation. **The Journal of Bone and Joint Surgery Am**, Boston, v.55-A, n.2, p.322-330, 1973.

PORNPRASERTSUK, S.; LUDLOW, J.B.; WEBBER, R.L.; TYNDALL, D.A.; SANHUEZA, A.I.; YAMAUCHI, M. Fractal dimension analysis of weight-bearing bones of rats during skeletal unloading, **Bone**, New York, v.29, n.2, p.180-184, 2001.

REILLY, D.T.; BURSTEIN, A.H. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue, **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.8, p.393-405, 1975.

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

SCHAFFNER, G. Bone changes in weightlessness. 22 January 2001. Disponível em: <http://paperairplane.mit.edu/16.423J/Space/SBE/bone/bone_background.html>. Acesso em: 17 jan. 2006.

SCHNEIDER, V.S.; McDONALD, J. Skeletal calcium homeostasis and countermeasures to prevent disuse osteoporosis. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.36(Suppl 1), p.S144-S151, 1984.

SEDLIN, E.D. A rheologic model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Copenhagen, Supplementum 83, 1965.

SHAW, S.R.; ZERNICKE, R.F.; VAILAS, A.C.; DELUNA, D.; THOMASON, D.B.; BALDWIN, K.M. Mechanical, morphological and biochemical adaptations of bone and muscle to hindlimb suspension and exercise. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v.20, n.3, p.225-234, 1987.

SHEN, M.L.; WRONSKI, T.J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, New York, v.20, n.1, p.55-61, 1997.

SHIMANO, M.M.; SHIMANO, A.C.; VOLPON, J.B. Histerese de fêmures de ratas submetidos a ensaios de flexão, em diferentes faixas etárias. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.89-97, 2002.

SILVA, A.V.; VOLPON, J.B. Modelo de simulação de microgravidade e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.12(1), p.22-31, 2004.

SMITH, S.M.; HEER, M. Calcium and bone metabolism during space flight. **Nutrition**, New York, v.18, p.849-852, 2002.

SOUZA, S.A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**, Ed. Edgard Blücher LTDA, São Paulo – Brasil, 1982.

TAPP, E. Tetracycline labeling methods of measuring the growth of bone in the rat. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v.48B, n.3, p.517-525, 1966.

TIMOSHENKO, S.; NORONHA, A.A. **Resistência dos materiais**, Ed. Gertum Carneiro, Rio de Janeiro - Brasil, 1945.

TUREK, S.L. **Ortopedia: princípios e sua aplicação**. v.1, Editora Manole LTDA. Tradução da quarta edição norte-americana, São Paulo – Brasil, 1991.

TURNER, R.T. Mechanical signaling in the development of postmenopausal osteoporosis. **Lupus**, Houndmills, v. 8, p. 388-392, 1999.

TURNER, R.T. Physiology of a microgravity environment. Invited Review: What do we know about the effects of spaceflight on bone? **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.89, p.840-847, 2000.

TURNER, C.H.; BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, New York, v.14, p.595-608, 1993.

TUUKKANEN, J.; PENG, Z.; VÄÄNÄNEN, H.K. Effect of running exercise of the bone loss induced by orchidectomy in the rats. **Calcified Tissue international**, Berlin, v.55, p.33-37, 1994.

VADJA E.G.; BOWMAN, B.M.; MILLER, S.C. Cancellous and cortical bone mechanical properties and tissue dynamics during pregnancy, lactation and postlactation in the rat. **Biology of reproduction**, New York, v.65, p.689-695, 2001.

Van der MEULEN, M.C.H.; MOREY-HOLTON, E.R.; CARTER, D.R. Hindlimb suspension diminishes femoral cross-sectional growth in the rat. **Journal of Orthopedic Research**, New York, v.13, p.700-707, 1995.

Van der WIEL, H.E.; LIPS, P.; GRAAFMANS, W.C.; DANIELSEN, C.C.; NAUTA, J.; Van LINGEN, A.; MOSEKILDE, L. Additional weight-bearing during exercise is more important than duration of exercise for anabolic stimulus of bone: a study of running exercise in female rats. **Bone**, New York, v.16, n.1, p.73-80, 1995.

VICO, L.; LAFAGE-PROUST, M.-H; ALEXANDRE, C. Effects of gravitational on the bone system in vitro and in vivo. **Bone**, New York, v.22, n.5, Suppl., p.95S-100S, 1998.

VOGEL, H.G. Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical parameters of rat bone. **Gerontology**, Basel, v.25, p.16-23, 1979.

VOLPON, J.B. A marcação do osso com substâncias fluorescentes. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.20, n.5, 1985.

WRONSKI, T.J.; MOREY, E.R. Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats. **American Journal Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.244, p.R305-R309, 1983.

WRONSKI, T.J.; MOREY-HOLTON, E.R. Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, Washington, v.58, p.63-68, 1987.

YEH, J.K.; ALOIA, J.F.; TIERNEY, J.M.; SPRINTZ, S. Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: Determined by dual energy X-ray absorptiometry. **Calcified Tissue International**, Berlin, v.52, p.234-238, 1993.

ZHANG, G.; QIN, L.; SHI, Y.; LEUNG, K. A comparative study between axial compression and lateral fall configuration tested in rat proximal femur model. **Clinical Biomechanics**, Oxford, v.20, p.729-735, 2005.

ANEXOS

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.

ANEXO B – Tabelas B₁, B₂, B₃, B₄ e B₅ - Massa corporal dos animais no início e final dos principais procedimentos.

ANEXO C – Tabelas C₁ e C₂ – Propriedades mecânicas obtidas do ensaio de flexo-compressão realizado na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais.

ANEXO D – Tabelas D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅ – Propriedades mecânicas obtidas do ensaio de flexão realizado no corpo de prova de osso cortical do fêmur direito dos animais.

ANEXO A – 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
"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

Folha de Informação rubricada sob Nº
do processo Nº (a)

Interessado(a): MARCOS MASSAO SHIMANO

Orientador(a): Prof. Dr. JOSÉ BATISTA VOLPON

Assunto: Avaliação do projeto de pesquisa: "*Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercício*".

INFORMAÇÃO

O projeto intitulado "*Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercício*", foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 17ª Reunião Ordinária, realizada em 25 de outubro de 2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Protocolo Nº 038/2003.

Ribeirão Preto, 25 de outubro de 2004.

Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Massa corporal dos animais no início e final dos principais procedimentos.**Tabela B₁ – Massa corporal dos animais do grupo Controle I no início e final dos procedimentos.**

Animais	Massa corporal dos animais do grupo Controle I (g)	
	Início (90 dias de idade)	Final (118 dias de idade)
01	350	370
02	310	325
03	350	355
04	335	335
05	265	280
06	325	345
07	305	330
08	305	315
09	325	340
10	310	325
11		
12		
Média	318,00	332,00
Desvio Padrão	25,19	24,29

Tabela B₂ – Massa corporal dos animais do grupo S no início e final da suspensão.

Animais	Massa corporal dos animais do grupo S (g)	
	Início da suspensão (90 dias de idade)	Final da suspensão (118 dias de idade)
01	310	285
02	355	345
03	335	300
04	290	265
05	325	315
06	295	230
07	315	295
08	320	315
09	280	255
10	275	270
11		
12		
Média	310,00	287,50
Desvio Padrão	25,28	33,69

Tabela B₃ – Massa corporal dos animais do grupo Controle II nas idades correspondentes aos inícios e finais dos procedimentos.

Animais	Massa corporal dos animais do grupo Controle II (g)		
	Início (90 dias de idade)	(118 dias de idade)	Final (139 dias de idade)
01	380	385	390
02	350	375	375
03	330	360	370
04	345	355	360
05	340	355	360
06	325	345	350
07	325	340	340
08	330	335	335
09	300	325	325
10	290	295	295
11	340	355	360
12	325	340	340
Média	331,67	347,08	350,00
Desvio Padrão	23,09	23,40	25,23

Tabela B₄ – Massa corporal dos animais do grupo S-L no início da suspensão, no início da liberação e no final da liberação.

Animais	Massa corporal dos animais do grupo S-L (g)		
	Início da suspensão (90 dias de idade)	Final da suspensão e início da liberação (118 dias de idade)	Final da liberação (139 dias de idade)
01	355	330	355
02	395	375	365
03			
04	340	320	345
05	375	340	355
06	335	310	340
07	335	315	350
08	325	310	335
09	295	285	320
10	370	345	385
11			
12			
Média	347,22	325,56	350,00
Desvio Padrão	30,01	25,79	18,54

Tabela B₅ – Massa corporal dos animais do grupo S-T no início da suspensão, no início do treinamento e no final do treinamento.

Animais	Massa corporal dos animais do grupo S-T (g)		
	Início da suspensão (90 dias de idade)	Final da suspensão e início do treinamento (118 dias de idade)	Final do treinamento (139 dias de idade)
01	290	280	310
02	295	260	300
03	305	285	320
04	355	345	385
05	330	330	365
06			
07	310	275	340
08	325	325	340
09	310	285	320
10	310	285	330
11	310	305	340
12			
Média	314,00	297,50	335,00
Desvio Padrão	18,68	27,51	25,39

ANEXO C – Propriedades mecânicas obtidas do ensaio de flexo-compressão realizado na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais.

Tabela C₁ – Valores da Rigidez obtidos do ensaio de flexo-compressão realizado na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais.

Animais	Rigidez ($\times 10^3$ N/m)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	120,938	252,456	251,647	249,021	280,766
02	202,709	164,774	240,469	351,825	336,088
03	201,950	170,924	278,636		299,299
04	257,854	278,618	398,314	329,583	340,531
05	170,896	280,634	376,294	289,187	349,049
06	206,503	147,071	218,847	200,365	
07	176,980	157,839	302,209	253,669	292,821
08	167,079	86,789	190,429	247,699	224,616
09	358,997	130,517	238,168	248,993	197,758
10	229,769	228,468	427,835	251,828	268,678
11			217,308		163,571
12			305,846		
Média	209,367	189,809	287,167	269,130	275,318
Desvio Padrão	64,464	66,262	77,155	46,679	62,726

Tabela C₂ – Valores da Força máxima obtidos do ensaio de flexo-compressão realizado na extremidade proximal do fêmur esquerdo dos animais.

Animais	Força máxima (N)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	94,05	88,22	113,11	88,88	123,79
02	105,32	71,52	125,55	99,23	112,72
03	102,76	68,31	128,44		145,40
04	101,26	96,34	111,80	123,39	124,70
05	96,87	91,69	134,99	113,44	129,68
06	106,23	79,84	100,99	111,08	
07	109,18	109,57	104,40	85,21	108,33
08	77,22	71,52	90,78	118,59	104,40
09	116,25	98,70	116,38	104,45	91,92
10	105,51	87,50	117,76	100,09	110,67
11			110,82		102,76
12			125,55		
Média	101,46	86,32	115,05	104,93	115,44
Desvio Padrão	10,53	13,47	12,57	12,94	15,54

ANEXO D – Propriedades mecânicas obtidas do ensaio de flexão realizado no corpo de prova de osso cortical do fêmur direito dos animais.

Tabela D₁ – Valores da tensão no limite de proporcionalidade obtidos do ensaio de flexão realizado no corpo de prova do fêmur direito dos animais.

Animais	Tensão no limite de proporcionalidade (MPa)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	125,10	134,60	151,82	123,33	176,72
02	136,57	147,51	161,63	173,56	158,56
03	120,18	132,58	134,62		162,57
04	128,65	147,40	136,84	138,56	128,88
05	169,07	176,33	119,03	201,53	154,54
06	161,58	120,51	157,88	137,13	
07	134,07	116,59	145,56	112,13	155,83
08	153,58	105,17	135,90	148,65	158,18
09	195,36	117,26	175,16	135,48	147,19
10	150,74	138,46	129,71	155,82	114,87
11			163,59		187,99
12			181,27		
Média	147,49	133,64	149,42	147,36	154,53
Desvio Padrão	23,34	20,47	19,05	27,01	21,06

Tabela D₂ – Valores da deflexão no limite de proporcionalidade obtidos do ensaio de flexão realizado no corpo de prova do fêmur direito dos animais.

Animais	Deflexão no limite de proporcionalidade ($\times 10^{-3}$ m)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	0,221	0,202	0,199	0,184	0,219
02	0,188	0,209	0,198	0,209	0,173
03	0,162	0,202	0,160		0,185
04	0,189	0,189	0,177	0,206	0,164
05	0,240	0,230	0,145	0,226	0,184
06	0,198	0,194	0,172	0,193	
07	0,238	0,253	0,185	0,158	0,187
08	0,187	0,212	0,156	0,143	0,180
09	0,250	0,238	0,226	0,177	0,173
10	0,244	0,160	0,202	0,177	0,176
11			0,187		0,216
12			0,175		
Média	0,212	0,209	0,182	0,186	0,186
Desvio Padrão	0,031	0,027	0,023	0,026	0,018

Tabela D₃ – Valores do módulo de elasticidade obtidos do ensaio de flexão realizado no corpo de prova do fêmur direito dos animais.

Animais	Módulo de elasticidade (GPa)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	6,804	9,254	8,169	7,195	10,438
02	8,627	10,179	7,709	11,190	11,678
03	8,465	9,400	9,189		10,596
04	8,491	10,868	10,088	8,218	10,095
05	9,342	9,838	8,305	10,561	12,043
06	9,160	6,856	10,526	9,502	
07	7,048	5,266	9,656	7,769	11,727
08	10,540	5,277	11,618	12,798	12,294
09	10,510	5,660	8,994	9,000	11,539
10	7,875	11,951	8,211	11,159	9,091
11			11,776		12,951
12			12,888		
Média	8,69	8,45	9,76	9,71	11,25
Desvio Padrão	1,26	2,47	1,66	1,85	1,16

Tabela D₄ – Valores da tensão máxima obtidos do ensaio de flexão realizado no corpo de prova do fêmur direito dos animais.

Animais	Tensão máxima (MPa)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	150,61	193,08	187,44	123,33	204,32
02	136,57	199,16	201,18	173,56	223,52
03	120,18	181,02	173,30		213,14
04	138,05	191,16	208,04	148,63	178,07
05	169,07	197,35	165,80	230,69	216,97
06	161,58	125,31	201,37	212,52	
07	134,07	128,45	217,90	112,13	218,76
08	153,58	107,21	201,59	223,48	175,40
09	195,36	131,02	226,72	164,24	189,15
10	169,95	172,62	177,17	201,96	150,21
11			222,33		244,61
12			212,64		
Média	152,90	162,64	199,62	176,73	201,41
Desvio Padrão	21,98	35,51	19,82	43,29	27,96

Tabela D₅ – Valores do módulo de tenacidade obtidos do ensaio de flexão realizado no corpo de prova do fêmur direito dos animais.

Animais	Módulo de tenacidade (x10 ³ MPa.m)				
	Grupo Cont I	Grupo S	Grupo Cont II	Grupo S-L	Grupo S-T
01	22,44	44,55	28,21	11,63	33,01
02	13,51	39,80	31,29	18,92	42,57
03	10,09	34,89	22,27		46,56
04	15,90	30,25	42,83	17,23	60,22
05	21,14	29,03	28,23	31,77	68,78
06	16,61	13,87	28,11	37,99	
07	16,73	21,11	55,01	9,22	72,93
08	14,87	12,80	46,83	27,13	19,60
09	25,00	21,44	44,24	20,73	29,37
10	30,22	22,42	33,02	31,00	29,02
11			36,08		54,52
12			23,45		
Média	18,65	27,02	34,96	22,85	45,66
Desvio Padrão	6,00	10,59	10,18	9,73	18,14