UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Maurício José Falcai

**Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela
cauda, como modelo de osteopenia**

Ribeirão Preto

2011

MAURÍCIO JOSÉ FALCAI

Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia

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

Área: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação

Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

Ribeirão Preto

2011

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

Falcai, Maurício, José

Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia. Ribeirão Preto, 2011.

74 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Suspensão pela cauda. 2. Tração cutânea. 3. Tração esquelética. 4 Osteopenia.5. Teste mecânico.6. Histomorfometria.

Esta tese foi redigida de
acordo com as Diretrizes
para apresentação de
dissertações e teses da
USP: documento eletrônico
e impresso Parte I (ABNT)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maurício José Falcai

Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda,
como modelo de osteopenia.

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

Área de Concentração: Ortopedia,
Traumatologia e Reabilitação.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais

José e Cleide, que com amor, carinho e dedicação, sempre me apoiaram em todas as etapas de minha vida.

Ao meu irmão e família

João Marcelo, Marisa e Mariana, pelo amor e amizade que nos une.

À

Andréa, pelo constante apoio, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao *Professor Doutor José Batista Volpon*, pela paciência, as acuradas leituras, os acertados comentários e inúmeras sugestões feitas durante o desenvolvimento da pesquisa e a escrita da dissertação.

Pessoa esta, que admiro muito, exemplo de dedicação e seriedade no que faz.
Meu orientador e amigo, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por concretizar este trabalho com amor e saúde.

Quero agradecer ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em especial aos Laboratórios de Bioengenharia, Fisiologia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e ao Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP.

Aos demais professores do curso de Pós-Graduação, por todas as experiências conjuntas e compartilhadas.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação, que seja pela amizade ou pelo trabalho, contribuíram para essa dissertação.

Aos funcionários da Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto.

A todos os amigos da pós-graduação pelos bons momentos de convívio, que de uma forma ou outra me ajudaram.

Às secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, pela colaboração.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FALCAI, MJ. **Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia.** 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introdução: A suspensão do rato pela cauda é método usado para simular os efeitos da microgravidade e hipoatividade física sobre o sistema musculoesquelético e outros sistemas. O método convencional usa a tração cutânea para a fixação da cauda do animal ao sistema de suspensão, sendo idealmente aplicado durante até três semanas. Depois desse período surgem lesões cutâneas, situações estressantes e soltura dos animais. Estes fatos limitam observações por períodos mais longos. O objetivo deste trabalho foi propor e avaliar um sistema de suspensão do rato pela cauda que utiliza tração esquelética com fio de Kirschner atravessado na vértebra caudal, comparando sua eficiência como modelo de osteopenia com a tração cutânea convencional, durante três e seis semanas. **Metodologia:** 60 ratas foram distribuídas em seis grupos (n=10): GI - três semanas-suspensão pela cauda em tração esquelética; GII - três semanas-suspensão em tração cutânea; GIII - três semanas sem suspensão; GIV - seis semanas-suspensão em tração esquelética; GV - seis semanas-suspensão em tração cutânea; GVI - seis semanas sem suspensão. **Avaliação** foi clínica com preenchimento de lista diária de achados de estresse e exame *post-mortem* com determinação dos níveis de corticosterona plasmática e estado da mucosa gastroesofágica. Avaliação dos efeitos da suspensão sobre osso ocorreu por meio da determinação da densidade mineral óssea, ensaio mecânico e histomorfometria, realizados tanto no fêmur, quanto no úmero. **Resultados:** não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos suspensos observados durante três semanas, para quaisquer dos parâmetros investigados.

Entretanto, em seis semanas, sete animais (70%) em tração cutânea foram perdidos por lesões de pele e, na tração esquelética, apenas um (10%). Quanto ao ganho de peso corporal e os outros parâmetros clínicos não houve diferenças entre os grupos suspensos por seis semanas. A densidade mineral óssea, força máxima, rigidez e parâmetros histomorfométricos dos fêmures diminuíram até três semanas quando os animais suspensos foram comparados com os controles. Entretanto, depois estabilizaram, tanto para os animais suspensos pela tração cutânea, quanto esquelética, sem diferenças entre eles. No úmero não houve diferenças importantes entre os animais suspensos e os controles. Conclusão: O sistema de tração esquelética foi mais eficiente para manter os animais suspensos até seis semanas, quando o número de complicações foi menor que na tração cutânea. A eficiência de ambos os métodos de suspensão em termos de enfraquecimento ósseo foi semelhante em ambos grupo.

Palavras chave: suspensão pela cauda; tração cutânea; tração esquelética; osteopenia; teste mecânico; histomorfometria

ABSTRACT

FALCAI, MJ. **Development of a modified system of tail suspension of the rat as a model of osteopenia.** 2011. 70 p. Dissertation (Master) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2011.

Background: Suspension of the rat by the tail is a method that is used to simulate the effects of microgravity and physical hypoactivity on the musculoskeletal system and also on other systems. The conventional suspension method uses the skin traction for fixing the animal to the suspension system and it is ideally applied for three weeks. After this period of time, skin lesions, stressful conditions and animal loosening may occur. These facts limit observations for longer periods of time. The aim of the present study was to propose and evaluate a rat tail suspension system using skeletal traction with a crossing Kirschner wire in the tail vertebra and to compare it with the conventional skin traction method, during three and six weeks. Methods: 60 rats allocated in six groups (n = 10): GI - three-week tail suspension in skeletal traction; GII - three week skin traction-suspension; GIII - three weeks without suspension; GIV - six-week suspension skeletal traction; GV - six weeks in cutaneous traction, GVI - six weeks without any suspension. Clinical evaluation was made filling up a daily list of findings of stress indicators and, at the end of the experimental period, by post-mortem examination, with determination of plasma corticosterone levels and status of the gastroesophageal mucosa. Evaluation of the effects of suspension on bone was carried out by the determination of bone mineral density, histomorphometry and mechanical tests that were conducted both in femurs and humerus. Results: no statistically significant difference was observed between groups for three weeks for the suspended animals, for any of the parameters investigated. In six weeks, seven suspended animals in skin traction were lost by skin lesions (70%) and, in skeletal traction, one (10%). As

for the weight gain and other clinical parameters no differences was observed between the suspended groups. Comparison between suspended and control animals showed that bone mineral density, maximum strength, stiffness and histomorphometric parameters of the femur of suspended decreased in three weeks and then stabilized for both groups suspended by the skin traction and skeleton, with no differences between them. Humerus presented no significant differences between suspended animals and controls. Conclusion: The system of skeletal traction was more efficient to keep the animal suspended for six weeks, when the number of complications was lower than in the skin traction group. Both suspension methods had the same efficiency to weaken the bone.

Key words: tail suspension; skin traction; skeletal traction; osteopenia; mechanical testing; histomorphometry

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático da gaiola de experimentação, composta por um compartimento inferior em acrílico, com uma portinhola para acesso ao interior e por uma gaiola metálica superior que se encaixa de maneira invertida na inferior, de modo a formar um compartimento único (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010)..... 32

Figura 2 - Desenho esquemático dos procedimentos de preparação da cauda do animal para a suspensão. (A) Cauda do animal. (B) Posicionamento de duas espumas adesivas. (C) Aplicação da bandagem elástica envolvendo toda a espuma e a colocação de uma fita estreita para formar uma alça. (D) Amputação da extremidade não enfaixada, para evitar necrose (Shimano e Volpon, 2009)..... 34

Figura 3 – Sequência de procedimentos de preparação da cauda do animal para a instalação da tração esquelética. (A) Cauda do animal após a tricotomia e antissepsia do local. (B) Identificação por palpação da quinta vértebra caudal. (C) Aplicação do fio de Kirschner com um perfurador elétrico. (D) Aspecto da transfixação da vértebra caudal pelo fio de Kirschner para acoplar o mecanismo de suspensão. 35

Figura 4 – Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de suspensão estabelecido pela tração esquelética. A - Estribo metálico para acoplamento do fio Kirschner em uma extremidade e mecanismo girador na alça. B – Fixação do estribo em uma presilha deslizante acoplada a uma barra cilíndrica rosqueada e com limitadores de excursão nas extremidades. C – Esquema da montagem final, com o animal suspenso de modo a ficar sem apoio nos membros posteriores e movimentar-se por meio do apoio nos membros anteriores (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010). 36

Figura 5 – Imagens detalhadas dos principais componentes do sistema de suspensão estabelecido pela tração esquelética. A - Estribo metálico para acoplamento

do fio Kirschner em uma extremidade e mecanismo girador na alça. B – Fixação do estribo em uma presilha deslizante acoplada a uma barra cilíndrica rosqueada e com limitadores de excursão nas extremidades. Aplicação de uma espuma entre a cauda e o estribo para evitar o contato entre a cauda e estribo metálico. C - Radiografia do animal com o fio de Kirschner inserido na vértebra caudal. D – Esquema da montagem final, com o animal suspenso de modo a ficar sem apoio nos membros posteriores e movimentar-se por meio do apoio nos membros anteriores (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010). 36

Figura 6 – Desenho esquemático que mostra as regiões da face do rato em que surgem pigmentação de porfirina como resposta às condições de estresse. As regiões periorbitária e focinho numeradas de 0 sem depósito de porfirina e 4 para a quantidade máxima de porfirina encontrada na região (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010). 38

Figura 7 - Aspecto do fêmur (A) e úmero (B) após limpeza das partes moles aderentes. 40

Figura 8 – Imagens do aparelho e software utilizados para as análises densitométricas. A - Densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR®. B - Tela do computador demonstrando o software Lunar® utilizado para as análises densitométricas por absormetria de raios X de dupla energia (DXA). 41

Figura 9 – Etapas para realização dos ensaios de flexocompressão do fêmur. A – Inclusão da parte distal do osso em bloco esférico de acrílico, de modo a facilitar o posicionamento para a aplicação da carga. B – O osso é posicionado verticalmente com aplicação da carga no topo da cabeça femoral. C – Detalhe da aplicação de carga. 42

Figura 10 – Aspecto da montagem para o teste de flexão de três pontos. O úmero foi apoiado em suporte metálico com 18,0 mm de separação entre os pontos fixos e a força foi aplicada no centro da diáfise, sobre a face posterior do osso. 42

Figura 11 – Gráficos representativos da evolução do peso corporal médio ao longo do experimento nos vários grupos: G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas). Não houve diferença estatística entre as várias comparações entre os grupos para um mesmo período de observação..... 47

Figura 12 - Níveis médios da concentração de corticosterona plasmática ($\pm$ DP) dos grupos G-I, G-II e G-III, ao final de três semanas, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,980$). 48

Figura 13- Gráficos representativos dos grupos experimentais para densidade óssea do fêmur. As linhas conectoras ilustram as diferenças significativas ($p<0,05$).... 49

Figura 14- Gráficos representativos dos grupos experimentais para densidade óssea do úmero. As linhas conectoras ilustram as diferenças significativas ($p<0,05$)... 49

Figura 15 - Gráficos representativos dos valores médios das forças no limite máximo dos úmeros, em relação aos grupos experimentais. O conector mostra a diferença significativa ($p<0,05$)..... 51

Figura 16 - Gráficos representativos dos valores médios das forças no limite máximo dos fêmures, em relação aos grupos experimentais. Os conectores mostram as diferenças significativas ($p<0,05$). 52

Figura 17 - Gráficos representativos dos valores médios da rigidez dos úmeros, em relação aos grupos experimentais. Os conectores mostram as diferenças significativas ($p<0,05$). 52

Figura 18 - Gráficos representativos dos valores médios da rigidez dos fêmures, em relação aos grupos experimentais. O conector mostra a diferença significativa ($p < 0,05$). 53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da densidade óssea obtida pela análise realizada no fêmur e úmero avaliados nos grupos G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas)..... 48

Tabela 2 - Valores das cargas no limite máximo dos fêmures submetidos aos ensaios de flexocompressão e dos úmeros aos ensaios de flexão em três pontos, até a ruptura nos grupos G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas)..... 50

Tabela 3 - Parâmetros histomorfométricos avaliados nos grupos G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas)..... 54

SUMÁRIO

1	Introdução	21
1.1	Tecido ósseo	21
1.2	Osteoporose	22
1.3	Modelos de animais utilizados para induzir osteopenia	24
1.4	Modelos utilizados para simulação da microgravidade e seus efeitos sobre o osso ..	25
1.5	Objetivos	29
2	Material e Método	31
2.1	Animais	31
2.1.1	Alojamento	31
2.2	Grupos experimentais	32
2.3	Técnica de suspensão	33
2.3.1	Tração cutânea	33
2.3.2	Tração esquelética	34
2.4	Sistema de suspensão	35
2.5	Avaliações clínicas dos animais	37
2.5.1	Condições técnicas	37
2.5.2	Tolerância	37
2.5.3	Avaliação do estresse	37
2.6	Avaliação dos efeitos da suspensão sobre osso	39
2.6.1	Densitometria óssea (DXA)	40
2.6.2	Ensaio mecânico do fêmur e úmero	41
2.6.3	Histomorfometria	42
2.6.4	Análise estatística	43
3	Resultados	46
3.1	Avaliação clínica dos animais	46
3.1.1	Condição técnica	46
3.1.2	Peso corpóreo	46
3.1.3	Avaliação do estresse	47
3.2	Densitometria óssea (DXA)	48
3.3	Ensaio mecânico	50
3.3.1	Força máxima	51
3.3.2	Rigidez	52
3.4	Histomorfometria	53
4	Discussão	57
4.1	Indicadores de estresse	58

4.2	Avaliação dos efeitos da suspensão sobre o osso.....	59
5	Conclusões.....	65
6	Referências bibliográficas	67
Anexo		74

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo possui várias funções: proteger órgãos, sustentar e conformar o corpo, propiciar sistema de alavancas musculares, deslocar o corpo, abrigar a medula óssea e atuar como reservatório homeostático de íons de cálcio e potássio, (GUYTON, 1992). Além disso, ele deve ser resistente para suportar as cargas, bem como leve para facilitar os movimentos e economizar energia (TURNER, 2006).

O osso não é inerte como possa parecer, mas é tecido conjuntivo especializado em constantes modificações, composto de células, substância intracelular densa, nervos e vasos sanguíneos. De acordo com a disposição espacial das trabéculas eles são divididos em dois tipos: o osso trabecular (esponjoso) e o osso cortical (compacto). No primeiro tipo as trabéculas ou lamelas são bem individualizadas e tem disposição variada, de modo a formar espaços intertrabeculares, ocupados pela medula óssea. No osso compacto as trabéculas tem orientação comum, colocando-se justapostas umas às outras de modo a formar uma estrutura densa. Neste caso, a medula óssea ocupa um canal central: o canal medular. As células ósseas – osteócitos – situam-se em pequenas lacunas que emitem minúsculas ramificações que fazem conexão com os espaços vizinhos e por onde há trocas de metabólitos e catabólitos. Os osteócitos são células maduras, sem capacidade de reprodução e tem a função de manter o trofismo ósseo.

Osteoblastos são células com grande metabolismo que secretam a matriz orgânica que se deposita em torno dela, que sofre depósito de minerais, de modo que o osteoblasto aí fica aprisionado e constituirá o osteócito. Os osteoclastos são células multinucleadas cuja principal função é a reabsorção óssea. São ricas em fosfatase alcalina e escavam espaços chamados lacunas de Howship. Os osteoblastos e osteoclastos funcionam em harmonia de modo que sempre existe correlação entre

formação e reabsorção óssea. Este mecanismo é importante para a remodelação óssea, tanto em termos de macro, como de microanatomia. Esta remodelação é importante para que o osso ao crescer sempre mantenha sua morfologia básica e também sua microarquitetura interna. Durante este processo, podem ser feitos reajustamentos, enquanto o osso aumenta de tamanho. O processo de deposição e reabsorção do osso continua ao longo da vida (GARDNER et al., 1967), embora seja mais intenso na fase de crescimento.

Segundo a Lei de Wolf, a estrutura do osso adapta-se à sua função por meio de reorganização do sistema microestrutura interna. Locais com maior demanda mecânica tendem a ficar com maior densidade de trabéculas, enquanto que o oposto é verdadeiro: diminuição da função causa diminuição do trabeculado e da densidade óssea. Esta última condição é observada em situações como períodos prolongados no leito, imobilizações, paralisias, voos espaciais, etc. Resulta a osteopenia ou mesmo a osteoporose, quando associam-se fraturas patológicas (BLOOMFIELD et al., 2002; TURNER, 2000). Com o desuso, o esqueleto parece reconhecer que todo o tecido ósseo não é mais necessário para manter a integridade estrutural e ocorre diminuição da densidade mineral, com deterioração da arquitetura estrutural (OHIRA et al., 2006).

1.2 Osteoporose

O termo “osteoporose” refere-se a alterações da microarquitetura óssea, que se caracterizam por redução qualitativa da matriz óssea, devido à perda progressiva de elasticidade e homogeneidade, tendo como consequência a diminuição do tecido ósseo. A osteoporose deve ser interpretada como um estado final de osteopenia (JAWORSKI et al., 1980) e tem seu conceito associado à ocorrência de fraturas patológicas (TURNER, 2000; BLOOMFIELD et al., 2002).

A osteoporose pode ser classificada em tipo I e II. O tipo I é característica da mulher no período pós-menopausa, provocado principalmente pela deficiência dos estrogênios, ocasionando aumento da atividade osteoclástica. Neste tipo de perda óssea está envolvido predominantemente o osso trabecular. O tipo II é caracterizado como um processo relacionado ao envelhecimento, à deficiência crônica de cálcio, ao aumento secundário do paratormônio e ao decréscimo da formação óssea pelos osteoblastos, envolvendo, principalmente, as perdas ósseas do componente cortical dos ossos longos (IANNETTA, 2006a).

O envelhecimento, principalmente na mulher, causa diminuição do tecido ósseo que, em graus acentuados, leva a fraturas patológicas, em decorrência da deterioração da microarquitetura e fragilidade óssea (NORDIN, 1983). Atualmente, o aumento da expectativa de vida tem levado a modificações na pirâmide populacional, com aumento da faixa etária mais velha, o que tem tornado a osteopenia/osteoporose, com seus efeitos deletérios, uma ocorrência quase de proporções epidêmicas.

A perda fisiológica do componente trabecular do início do período do climatério é muito discreta, ao redor de 0,4% ao ano, tornando os espaços acelulares mais amplos e as trabéculas mais finas, à medida que a idade avança. Principalmente nos cinco a dez anos após a data da menopausa a perda fisiológica situa-se em torno de 1% a 2% ao ano. As trabéculas tornam-se descontínuas, apresentam aumento gradativo da reabsorção óssea e vão desaparecendo, com predomínio dos espaços acelulares. Acima de 65 anos, continua o processo de reabsorção óssea no tecido trabecular, com elevação da perda do componente cortical (IANNETTA, 2006b).

Os esforços no combate as diminuições do tecido ósseo ocorrem em várias vertentes como o uso de fármacos que atuam positivamente no metabolismo ósseo, por exemplo, os bisfosfonados (AZUMA et al., 1998; BATCH et al., 2003; BONE,

SCHURR, 2004; LANG et al., 2004), na atividade física programada e regular (NORMAN et al., 2000; CAVANAGH et al., 2005), além de um estilo de vida saudável com alimentação adequada, sem tabagismo ou ingestão habitual de álcool e outras drogas (NEW et al., 2000).

Nesta linha, muitos modelos de tratamento são propostos e tem sido realizados ensaios clínicos em humanos (NIELSEN, MILNE, 2004). Entretanto, os ensaios terapêuticos são de longa duração, podem ter baixa adesão, além de serem realizados em uma população de faixa etária elevada, o que pode levar a um número alto de exclusões por interferência de comorbidades, uso de medicamentos, etc, o que leva à diminuição da amostra estudada.

Neste contexto, o uso de modelos animais tem a vantagem de, em tempo curto, permitir ensaios e intervenções terapêuticas que atuam como filtro inicial para uma etapa seguinte de otimização de experimentação em seres humanos.

1.3 Modelos de animais utilizados para induzir osteopenia

O modelo animal mais clássico de osteopenia é a ooforectomia da rata e tem sido usado como representativo do que ocorre no esqueleto da mulher após a menopausa (SIMÕES et al., 2008; SEEDOR et al., 1991; THOMPSON et al., 1995; TOU et al., 2008; ZARROW et al., 1964). Outros modelos foram propostos como imobilização do membro pélvico (THOMPSON et al., 1990; MILANI et al., 2008; VOLPON et al., 2008), secção do nervo ciático (BUFFELLI et al., 1997; GIGOBENATO et al., 2010) ou lesão medular (MORSE et al., 2008; ROY et al., 2007). Alguns desses modelos tem a desvantagem de causar alterações indesejáveis como afetar a sensibilidade, causar paralisias, interferir com o controle de esfíncteres, serem irreversíveis e ter alto índice de mortalidade. Assim, são usados quando se quer estudar

a osteoporose em situações muito específicas, por exemplo, aquela associada à paraplegia.

O modelo de suspensão de animais pela cauda foi inicialmente desenvolvido para estudar os efeitos fisiológicos causados pela microgravidade experimentada pelos astronautas durante voo espacial, mas foi, depois, empregado como um bom modelo de osteopenia induzida pela hipoatividade física (WIDRICK et al., 2008; HEFFERAN et al., 2003; MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002; MOREY, 1979; TURNER, 2000). Uma vantagem do sistema é sua reversibilidade, isto é, podem-se estudar os efeitos pós-hipoatividade física e estabelecer controles adequados (SHIMANO, VOLPON, 2009).

1.4 Modelos utilizados para simulação da microgravidade e seus efeitos sobre o osso

Análises extensas realizadas com ratos mantidos em órbitas espaciais têm contribuído bastante para o entendimento do mecanismo de adaptação esquelética humana à ausência da gravidade. Esses ratos apresentaram redução do tecido trabecular da metáfise da tíbia, redução da formação do osso periosteal na tíbia e diáfise femoral (JEE et al., 1983).

Entretanto, a exposição de animais em situações reais de microgravidade é muito dispendiosa, demorada e pouca acessível, o que estimula o desenvolvimento de modelos em terra que simulem as condições no espaço (COLLERAN et al., 2000).

Em 1974, o Dr Harold Sandeler, então chefe da Divisão de Pesquisa Biomédica do *Ames Research Center* (ARC), uma secção de pesquisa da NASA, propôs aos pesquisadores envolvidos com o programa de Biologia Espacial ARC a desenvolver em um modelo para ratos que simulasse os efeitos da microgravidade experimentados pelos

astronautas em missões espaciais. Este modelo não envolveria apenas o estudo do esqueleto, mas, principalmente, as alterações fisiológicas decorrentes sobre vários sistemas e órgãos como rins, pulmões, circulação cerebral, parâmetros hemodinâmicos, etc. Entre outras vantagens os animais poderiam ser observados com frequência e serem manipulados e sofrerem intervenções a qualquer momento durante o experimento, o que não ocorre com a mesma facilidade no ambiente da espaçonave (MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002).

Como consequência, MOREY, 1979, pesquisadora da NASA, a partir de uma técnica usada na então União Soviética, desenvolveu um modelo de suspensão pela cauda que, apesar de limitar a atividade física, tem sido bem tolerado pelos ratos e produz resultados bastante semelhantes àqueles da microgravidade experimentados pelos astronautas, em vários sistemas, inclusive no ósseo, onde provoca osteopenia de desuso.

Nesse modelo, o rato é suspenso pela cauda por meio de tração cutânea na cauda acoplada a um sistema de suspensão em uma gaiola especial. Uma bandagem elástica é aplicada sobre uma espuma colante protetora que reveste a cauda, de modo a envolvê-la por inteiro. Sobre o envoltório da tira elástica é colocada uma fita estreita fixada por enfaixamentos adicionais, de modo a formar uma alça que servirá para fixar o animal ao sistema de suspensão, por meio de uma presilha. A partir dessa data, outros modelos e métodos de suspensão de ratos pela cauda foram descritos (JASPERS, TISCHLER, 1984; KASPER et al., 1993; MATSUMOTO et al., 1998; MATSUURA et al., 2001; MOREY-HOLTON, GLOBUS, 1998; MUSACCHIA, DEEVERS, 1980; WINIARSKI et al., 1987).

Como a perda mineral óssea é um importante aspecto após períodos longos de hipoatividade (LANG et al., 2004), a suspensão do rato pela cauda mostrou-se um bom

modelo para estudos desses aspectos (MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002). De modo geral, o que se observa como resultado da aplicação do método nos membros posteriores é diminuição do tecido ósseo (BLOOMFIELD et al., 2002), diminuição da densidade óssea radiográfica (BIKLE, HALLORAN, 1999), enfraquecimento ósseo (SHIMANO, VOLPON, 2009; TURNER, 2000), redução do conteúdo de cálcio (GLOBUS et al., 1984) e diminuição da taxa de formação de osso cortical (WRONSKI, MOREY, 1983) e trabecular (VICO et al., 2000; WRONSKI, MOREY-HOLTON, 1987).

Entretanto, nesse modelo há alguns fatores limitantes como tempo de suspensão, geralmente estabelecido em três semanas, pois após este período há tendência de o animal soltar-se por descamação ou lesões da pele. Outra dificuldade é que é difícil a graduação da tensão do enfaixamento. Se muito apertado, provocará necrose da extremidade da cauda ou ulcerações. Se frouxo, permitirá o escape do animal.

Na tentativa de superar essas dificuldades, KNOX et al., 2004 propuseram a substituição do enfaixamento por um sistema de ancoragem representado por um pino atravessado subcutaneamente na cauda do rato. Embora estes autores não tenham relatado problemas com o sistema, tentamos reproduzi-lo em nosso laboratório e ocorreram inúmeras complicações como necrose da pele com soltura do pino, infecção e altos níveis de estresse do animal evidenciado pela perda de peso, perda do apetite e surgimento de pigmentação de porfirina em torno dos olhos e focinho. Não encontramos na literatura relatos de outros autores quanto à adequação ou não deste sistema.

Mais recentemente, FERREIRA et al., 2011 propuseram uma modificação do sistema de tração representado por um fio cirúrgico de aço flexível 2.0 (espessura em torno de 0,33 mm), longo, que é atravessado no 5º, 6º ou 7º espaços do disco intervertebral da cauda de camundongos que ficaram suspensos por quatro semanas. Os

autores analisaram efeitos gerais e locais nos animais e concluíram que o método representa vantagens sobre o sistema cutâneo convencional.

Na presente investigação é proposto o estudo de uma variação do modelo de suspensão de KNOX et al., 2004 em que o pino metálico, ao invés de ficar inserido nas partes moles, seja inserido transesqueleticamente na vértebra caudal, o que transforma um sistema de tração cutânea em esquelética, à semelhança do que já é tradicionalmente usado em ortopedia.

Hipóteses:

1 - O sistema de ancoragem pela tração esquelética será bem tolerado pelos animais e permitirá maior tempo de observação.

2 - O tempo maior que três semanas em suspensão poderá provocar acentuação da osteopenia.

1.5 Objetivos

Objetivo geral:

Desenvolver e testar um modelo de suspensão do rato pela cauda pela tração esquelética, realizada por meio de um pino metálico transfixando uma vértebra caudal.

Objetivos específicos:

- Verificar a eficácia do modelo proposto na manutenção dos animais em suspensão, em comparação com a tração cutânea.
- Analisar os efeitos no tecido ósseo após três semanas de suspensão dos animais.

MATERIAL E MÉTODO

2 Material e Método

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com o protocolo nº 063/2009 (anexo 1) e foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

2.1 Animais

Foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* com peso corporal médio inicial entre 190-220 g (média 205 g; 10 a 12 semanas de idade) e fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

2.1.1 Alojamento

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente calmo, com controle de temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12h), umidade do ar, bem como controle de outras condições ambientais que pudessem causar estresse dos animais tais como barulho, irregularidade de iluminação e circulação de pessoas. Antes de serem submetidos a qualquer intervenção, as ratas ficaram duas semanas em ambientação, em gaiolas comuns, sem restrição de água ou ração.

Para acoplar o sistema de suspensão foi utilizado outro tipo de gaiola da mesma maneira como o empregado por SHIMANO, VOLPON, 2009, porém adaptada com uma porta no lado inferior para o acesso para coleta da ração e outros procedimentos e, assim facilitar o manuseio do animal. A gaiola é composta por um compartimento inferior cúbico construído em acrílico e aberta superiormente. Sobre esta abertura é encaixada uma gaiola metálica de mesmas dimensões, em posição invertida de modo a

formar um compartimento único (Figura 1). As dimensões da gaiola são: 35,0 cm de largura, 35,0 cm de comprimento e 21,5 cm de altura.

Figura 1 – Desenho esquemático da gaiola de experimentação, composta por um compartimento inferior em acrílico, com uma portinhola para acesso ao interior e por uma gaiola metálica superior que se encaixa de maneira invertida na inferior, de modo a formar um compartimento único (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010)

Os animais dos grupos controles permaneceram em gaiolas iguais as dos grupos suspensos, porém, sem os componentes do sistema de suspensão.

Todos os animais foram pesados uma vez por semana ao longo de todo o experimento em balança eletrônica com precisão de 5,0 g.

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais:

G I - suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética durante três semanas (n=10).

G II - suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea durante três semanas (n=10).

G III - grupo controle, sem sofrer intervenção a não ser receber a mesma quantidade de ração ingerida pelos animais suspensos, durante três semanas (n=10).

G IV - suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética durante seis semanas (n=10).

G V - suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea durante seis semanas (n=10).

G VI - grupo controle, sem sofrer intervenção, a receber ração *ad libitum* durante seis semanas. Manutenção em gaiolas comuns (n=10).

2.3 Técnica de suspensão

2.3.1 Tração cutânea

No modelo utilizado por SHIMANO, VOLPON, 2009, o sistema de suspensão é realizado por meio de tração cutânea, que é uma adaptação da técnica de KASPER et al., 1993. Para a instalação deste sistema a cauda do animal é preparada, mas, previamente, as ratas são anestesiadas com uma aplicação intramuscular da combinação de cloridrato de cetamina (Ketamina® Agener 10%) e xilazina (Doposer® Caller) na proporção de 30 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente. Em seguida, a cauda (Figura 2 - A) é lavada com água e detergente e aplicada tintura de benjoim em toda a pele. Depois, é envolvida com espuma adesiva (Reston® 3M do Brasil), desde a origem até os dois terços proximais, aproximadamente, com o objetivo de proteger a pele e evitar lesões cutâneas futuras (Figura 2 - B).

Sobre esta espuma adesiva é aplicada uma bandagem elástica tensionada homogeneamente. Sobre o envoltório da tira elástica é colocado um cordão estreito fixado por enfaixamentos adicionais, de modo a formar uma alça que serve para prender o animal ao sistema de suspensão, por meio de uma presilha (Figura 2 - C).

Ainda, com a rata anestesiada a extremidade da cauda que ficou sem enfaixamento foi amputada, para evitar necrose (Figura 2 - D).

Figura 2 - Desenho esquemático dos procedimentos de preparação da cauda do animal para a suspensão. (A) Cauda do animal. (B) Posicionamento de duas espumas adesivas. (C) Aplicação da bandagem elástica envolvendo toda a espuma e a colocação de uma fita estreita para formar uma alça. (D) Amputação da extremidade não enfaixada, para evitar necrose (Shimano e Volpon, 2009).

2.3.2 Tração esquelética

Na modificação proposta nesta pesquisa, a suspensão do animal pela cauda foi realizada por meio da transfixação de um fio de Kirschner de 1,0 mm de espessura na quinta vértebra da cauda do animal. Para a realização deste procedimento a rata foi anestesiada da maneira já descrita. Foi realizada tricotomia e antissepsia local com solução clorexedina alcoólica 0,5% do local. Com o uso de um perfurador elétrico, e controle de rotação, o fio de Kirschner reto foi transfixado transversalmente no centro da quinta vértebra na cauda, que foi identificada por palpação (primeira vértebra facilmente palpável no início da cauda; Figura 3).

Figura 3 – Sequência de procedimentos de preparação da cauda do animal para a instalação da tração esquelética. (A) Cauda do animal após a tricotomia e antissepsia do local. (B) Identificação por palpação da quinta vértebra caudal. (C) Aplicação do fio de Kirschner com um perfurador elétrico. (D) Aspecto da transfixação da vértebra caudal pelo fio de Kirschner para acoplar o mecanismo de suspensão.

Após a preparação da cauda, como analgésico foi adicionado paracetamol à água do bebedouro (duas gotas a cada 200 mL) durante cinco dias. Como antisséptico, clorexedina aquosa foi aplicada no local da saída dos fios de Kirschner.

2.4 Sistema de suspensão

Na tração esquelética, o fio de Kirschner foi acoplado a um estribo metálico que foi preso a uma presilha e dependurado em uma barra cilíndrica rosqueada com altura ajustável, no compartimento superior da gaiola (Figura 4 e 5). O estribo foi confeccionado na oficina mecânica de Precisão do Campus da USP em Ribeirão Preto a partir de uma barra cilíndrica de latão com as seguintes dimensões: 5,0 mm de espessura, 37,5 mm de altura e 25,0 mm de raio. Na extremidade inferior contém um

orifício de 1,0 mm de diâmetro por onde o fio de Kirschner foi acoplado, e o excesso de comprimento foi aparado. O fio de Kirschner foi fixado com um parafuso para evitar deslizamento.

Figura 4 – Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de suspensão estabelecido pela tração esquelética. A - Estribo metálico para acoplamento do fio Kirschner em uma extremidade e mecanismo girador na alça. B - Fixação do estribo em uma presilha deslizante acoplada a uma barra cilíndrica rosqueada e com limitadores de excursão nas extremidades. C – Esquema da montagem final, com o animal suspenso de modo a ficar sem apoio nos membros posteriores e movimentar-se por meio do apoio nos membros anteriores (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010).

Figura 5 – Imagens detalhadas dos principais componentes do sistema de suspensão estabelecido pela tração esquelética. A - Estribo metálico para acoplamento do fio Kirschner em uma extremidade e mecanismo girador na alça. B - Fixação do estribo em uma presilha deslizante acoplada a uma barra cilíndrica rosqueada e com limitadores de excursão nas extremidades. Aplicação de uma espuma entre a cauda e o estribo para evitar o contato entre a cauda e estribo metálico. C - Radiografia do animal com o fio de Kirschner inserido na vértebra caudal. D - Esquema da montagem final, com o animal suspenso de modo a ficar sem apoio nos membros posteriores e movimentar-se por meio do apoio nos membros anteriores (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010).

No sistema cutâneo, a alça de tecido que sai do enfaixamento da cauda (Figura 2

– C) foi acoplada a uma presilha. Em ambos os sistemas esta presilha foi conectada a uma barra cilíndrica rosqueada (Figura 4 – B) que se fixa no componente metálico da

gaiola e tem a altura ajustável de modo a permitir que o animal apoie suficientemente os membros anteriores para locomover-se e alimentar-se (Figura 4 – C). A inclinação tronco-assoalho foi de 30° (MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002). Na barra são colocados dois bloqueios metálicos nas extremidades, ajustados de modo a não permitir que o animal tenha contato com as paredes da gaiola. A água foi fornecida por meio de bebedouro colocado em altura adequada na parede da gaiola e ração comum foi colocada no assoalho, juntamente com maravalhas.

2.5 Avaliações clínicas dos animais

A avaliação clínica seguiu o protocolo recomendado por MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002. Para isto foi elaborada uma lista de verificação com os seguintes itens:

2.5.1 *Condições técnicas*

Avaliação diária das condições da cauda do animal tais como coloração, presença de edema e alterações cutâneas. Em ambos sistemas de tração foi observado se houve soltura do dispositivo, necessidade de ajustes e condições de cicatrização da pele junto ao fio ou enfaixamento.

2.5.2 *Tolerância*

A avaliação da tolerância foi feita pela observação das condições gerais do animal, consumo diário de ração e peso semanal.

2.5.3 *Avaliação do estresse*

Os animais foram inspecionados diariamente de acordo com a lista de conferência contendo os seguintes itens: aspecto geral, movimentação espontânea,

aspecto da região periorbitária e focinho (depósitos de porfirina; Figura 6), condições da pelagem, alimentação e massa corpórea semanal (KNOX et al., 2004).

Figura 6 – Desenho esquemático que mostra as regiões da face do rato em que surgem pigmentação de porfirina como resposta às condições de estresse. As regiões periorbitária e focinho numeradas de 0 sem depósito de porfirina e 4 para a quantidade máxima de porfirina encontrada na região (desenho fornecido pelo Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010).

O período máximo de observação foi estabelecido em três semanas para o Grupo I, Grupo II e Grupo controle III. Para os Grupos IV, V e Grupo controle VI foi estabelecido período de observação de seis semanas. Entretanto, as ratas foram retiradas da suspensão se apresentassem alterações clínicas ou técnicas relacionadas com o sistema de suspensão. Estes animais foram considerados como fracasso do sistema de acoplamento.

Todas as ratas que atingiram o tempo de observação estabelecido para o seu grupo foram pesadas e sacrificadas. O sacrifício dos animais foi feito por decapitação e, em seguida, coletado sangue para dosagem de corticosterona plasmática. O estômago e esôfago também foram examinados pós-mortem, abertos e analisados macroscopicamente à procura de alterações visuais que pudessem sugerir presença de ulcerações ativas/cicatrizadas, ou processos inflamatórios tais como: mudança de coloração, lesões ou cicatrizes na mucosa e aspecto da cárdia. Todos esses dados serviram como indicadores das condições de estresse do animal.

A análise dos níveis de corticosterona plasmática feita no sangue coletado por decapitação nos animais dos grupos de três semanas, e foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, de acordo com as

referências e protocolos recomendados para utilização da técnica por Radioimunoensaio de Corticosterona (RIAs). Foi determinada pelo método de VECSEI, 1979, que utiliza extração do esteróide com etanol e utilizado anticorpo anti-corticosterona (Sigma) preparado em coelhos. A corticosterona [1,2-3(H)] (New England Nuclear) foi utilizada como hormônio marcado e separação da fração livre da ligada foi utilizada uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05.

2.6 Avaliação dos efeitos da suspensão sobre osso

Ao final do período de observação e após o sacrifício, de cada animal foram coletados e limpos das partes moles os dois fêmures e os dois úmeros (Figura 7). O fêmur e úmero esquerdos foram mantidos em *freezer* e utilizados para ensaio mecânico e densitometria óssea. O fêmur e úmero direitos foram fixados em formol neutro 10% e destinados ao exame histomorfométrico.

Figura 7 - Aspecto do fêmur (A) e úmero (B) após limpeza das partes moles aderentes.

2.6.1 Densitometria óssea (DXA)

A densidade mineral óssea foi realizada no Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, com densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR® (Japão), com “software Lunar®” especial para pequenos animais, com alta resolução, e realizada em todo osso (Figura 8).

Previamente, os úmeros e fêmures foram dissecados, identificados e submetidos a análises densitométricas por absorimetria de raios X de dupla energia (DXA). Para isto, os ossos foram submersos em um recipiente plástico com água, alinhados corretamente e, em seguida, escaneados. Posteriormente, as imagens capturadas foram analisadas, a área selecionada foi feita no osso todo por meio de contornos, obtendo-se os valores de área, conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO). A densidade mineral óssea, obtida em g/cm^2 , foi medida em todo osso.

Figura 9 – Etapas para realização dos ensaios de flexocompressão do fêmur. A – Inclusão da parte distal do osso em bloco esférico de acrílico, de modo a facilitar o posicionamento para a aplicação da carga. B – O osso é posicionado verticalmente com aplicação da carga no topo da cabeça femoral. C – Detalhe da aplicação de carga.

Figura 10 – Aspecto da montagem para o teste de flexão de três pontos. O úmero foi apoiado em suporte metálico com 18,0 mm de separação entre os pontos fixos e a força foi aplicada no centro da diáfise, sobre a face posterior do osso.

2.6.3 Histomorfometria

O exame histomorfométrico do osso foi realizado na região condilar distal do fêmur direito e na cabeça do úmero direito. A fixação dos ossos ocorreu em formol neutro 10%, 4°C, por sete dias. Depois, as peças foram descalcificadas em ácido tricloroacético por quatro semanas, com trocas a cada dois dias.

Após esses procedimentos, os ossos foram submetidos ao processo de desidratação, corte, diafanização com a inclusão em parafina do segmento ósseo a ser analisado. Depois, seguiram para o micrótomo, sendo obtidos cortes sequenciais de 5µm de espessura no plano sagital, que foram corados com tricromo de Masson.

Para o exame das lâminas foi utilizado o microscópio Nikon Labophot-2A (Japan) acoplado a um sistema semiautomático de histomorfometria (OsteoMeasure XP, v1.0.30-Bone Histomorphometry System) do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo da Divisão de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As medidas foram realizadas em 16 campos por lâmina, em 20x de aumento. Os parâmetros histomorfométricos estudados foram os estruturais, seguindo a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research* (PARFITT et al., 1987) que são: volume trabecular - BV/TV (%) - é o volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas; espessura trabecular - Tb.Th (µm) - é a espessura das trabéculas ósseas; separação trabecular - Tb.Sp (µm) - é a distância entre os pontos médios das trabéculas ósseas; número de trabéculas - Tb.N (/mm) - é o número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido.

2.6.4 Análise estatística

A análise estatística dos resultados, a elaboração e a representação gráfica foram realizadas com auxílio dos programas estatísticos GraphPad Prisma versão 5.00 (San Diego, USA), SigmaPlot versão 11.0 (Chicago, USA). Nas comparações entre três grupos foi usado o método da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey. Nas comparações entre apenas dois grupos foi utilizado o teste “t” de Student para

amostras independentes. Todos os valores foram considerados como diferenças significantes para $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como médias e desvios padrão.

RESULTADOS

3 Resultados

3.1 Avaliação clínica dos animais

3.1.1 *Condição técnica*

Todos os animais dos grupos experimentais G-I e G-II (suspensas por três semanas) completaram o período proposto sem intercorrências. Entretanto, oito ratas dos grupos experimentais G-IV e G-V, programadas para ficar suspensas por seis semanas foram retiradas antes do período proposto, sendo que, sete eram do grupo experimental G-V (tração cutânea) e uma do grupo experimental G-IV (tração esquelética). O motivo da interrupção do grupo experimental (G-V) foi a ocorrência de lesões cutâneas na região do enfaixamento, nos dias 18º, 21º, 25º, 25º, 25º, 34º e 39º. A rata do grupo experimental G-IV foi retirada da suspensão por apresentar rubor e presença de edema na região do pino metálico no 14º dia.

3.1.2 *Peso corpóreo*

Os valores médios corpóreos semanais das ratas dos grupos experimentais estão apresentados na figura 11. Em todos os grupos foi observado que, a partir da primeira semana, tanto nos animais suspensos, como controles houve aumento do peso corpóreo em proporções semelhantes. Assim, a comparação do peso corpóreo ao longo do experimento não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais G-I, G-II e G-III ($p=0,075$), entre os grupos G-IV, G-V e G-VI ($p=0,508$) e entre os grupos G-III e G-VI ($p=0,264$).

Figura 11 – Gráficos representativos da evolução do peso corporal médio ao longo do experimento nos vários grupos: G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas). Não houve diferença estatística entre as várias comparações entre os grupos para um mesmo período de observação.

3.1.3 Avaliação do estresse

Os resultados da lista de conferência dos animais mostraram que nos primeiros dias da suspensão surgiram pigmentos de porfirina nas regiões periorbitária e focinho, com desaparecimento ao final da primeira semana. Porém, no grupo G-V (tração cutânea) destinado a permanecer suspenso durante seis semanas, após a quarta semana do experimento, reapareceram os depósitos de porfirina nas regiões periorbitária e focinho e a pelagem começou a ficar eriçada. Sete animais desse grupo foram retirados da suspensão por apresentar ferimentos na cauda.

Níveis plasmáticos de corticosterona: Os valores médios da corticosterona plasmática, obtidos dos grupos G-I, G-II e G-III estão apresentados na figura 12. A comparação intergrupos não mostrou diferença significativa entre eles ($p=0,98$).

Figura 12 - Níveis médios da concentração de corticosterona plasmática ($\pm$ DP) dos grupos G-I, G-II e G-III, ao final de três semanas, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,980$).

Estômago e esôfago: O estômago e esôfago dos animais de todos os grupos experimentais não apresentaram alterações macroscópicas que pudessem sugerir presença de ulcerações ou processos inflamatórios antigos ou recentes.

3.2 Densitometria óssea (DXA)

Os valores descritos na Tabela 1 representam a média da densidade, em g/cm^2 , do fêmur e úmero em todos os grupos experimentais.

Tabela 1 - Valores da densidade óssea obtida pela análise realizada no fêmur e úmero avaliados nos grupos G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas).

	G-I	G-II	G-III	G-IV	G-V	G-VI
Fêmur (g/cm^2)	0,1627 $\pm$ 0,0295	0,1630 $\pm$ 0,0195	0,2020 $\pm$ 0,0221*	0,1764 $\pm$ 0,0277	0,1571 $\pm$ 0,0209	0,2293 $\pm$ 0,0114 [#]
Úmero (g/cm^2)	0,1260 $\pm$ 0,0256	0,1119 $\pm$ 0,0184	0,1241 $\pm$ 0,0129	0,1252 $\pm$ 0,0154	0,1169 $\pm$ 0,0098	0,1245 $\pm$ 0,0087

Valores das médias e desvios padrão

* G-III > G-II e G-I ($p<0,05$)

[#] G-VI > G-V e G-IV ($p<0,05$)

Nos grupos observados por três semanas, a análise dos resultados da densidade óssea do fêmur (figura 13) do grupo G-III (controle) foi significativamente maior do que no grupo G-II e G-I ($p<0,05$).

A comparação entre G-II e G-I não mostrou diferença estatística ($p>0,05$).

Em relação ao grupo G-VI, G-V e G-IV, o grupo G-VI (controle) foi significativamente maior do que no grupo G-V e G-IV ($p<0,05$).

Figura 13- Gráficos representativos dos grupos experimentais para densidade óssea do fêmur. As linhas conectoras ilustram as diferenças significativas ($p<0,05$).

As análises dos resultados da densidade óssea do úmero (figura 14) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos G-I, G-II e G-III e entre os grupos G-IV, G-V e G-VI ($p>0,05$).

Figura 14- Gráficos representativos dos grupos experimentais para densidade óssea do úmero. As linhas conectoras ilustram as diferenças significativas ($p<0,05$).

3.3 Ensaio mecânico

Os valores médios ($\pm$ DP) das cargas no limite máximo dos úmeros (U) e fêmures (F), em todos os grupos experimentais: G-I, G-II, G-III, G-IV, G-V e G-VI estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores das cargas no limite máximo dos fêmures submetidos aos ensaios de flexocompressão e dos úmeros aos ensaios de flexão em três pontos, até a ruptura nos grupos G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas).

	G-I	G-II	G-III	G-IV	G-V	G-VI
Fêmur Força(N)	75,90 $\pm$ 11,70	76,91 $\pm$ 13,66	102,74 $\pm$ 12,83 [*]	80,10 $\pm$ 14,54	69,43 $\pm$ 12,19	112,34 $\pm$ 7,53 [#]
Fêmur Rigidez(N/mm)	104,99 $\pm$ 24,14	101,94 $\pm$ 29,65	128,20 $\pm$ 40,04	120,30 $\pm$ 15,31	109,34 $\pm$ 19,78	140,05 $\pm$ 29,22 ^{**}
Úmero Força(N)	51,15 $\pm$ 7,93	53,33 $\pm$ 6,83	58,96 $\pm$ 6,58	54,54 $\pm$ 11,34	49,06 $\pm$ 8,83	65,46 $\pm$ 8,96 ^{**}
Úmero Rigidez(N/mm)	124,01 $\pm$ 27,11	120,83 $\pm$ 14,34	148,03 $\pm$ 25,01 ^{Δ}	143,93 $\pm$ 30,87 ^{##}	105,85 $\pm$ 35,69	161,37 $\pm$ 21,03 ^{**}
Valores das médias e desvios padrão [*] G-III > G-II e G-I (p<0,05) ^{Δ} G-III > G-II (p<0,05) [#] G-VI > G-V e G-IV (p<0,05) ^{**} G-VI > G-V (p<0,05) ^{##} G-IV > G-V (p<0,05)						

A tabela 2 mostra diferença significativa entre os grupos experimentais de três semanas: G-I (tração esquelética), G-II (tração cutânea) e G-III (controle) representadas pelo símbolo (*), e, entre os grupos experimentais de seis semanas: G-IV (tração esquelética), G-V (tração cutânea) e G-VI (controle) representadas pelo símbolo ([#]). Os resultados significativos entre os grupos controle e suspenso por três semanas são representadas pelo símbolo (^{Δ}), e, entre os grupos controle e suspenso por seis semanas representadas pelo símbolo (**). As diferenças significativas entre os grupos suspensos por seis semanas são representadas pelo símbolo (^{##}).

3.3.1 Força máxima

Os valores médios da força no limite máximo (FM) dos úmeros (figura 15; tabela 2) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos G-I, G-II e G-III ($p=0,057$), entre os grupos G-VI e G-IV ($p=0,069$) e entre os grupos G-V e G-IV ($p=0,533$), porém o grupo G-VI apresentou resultado significativamente maior do que no Grupo G-V ($p<0,05$).

Figura 15 - Gráficos representativos dos valores médios das forças no limite máximo dos úmeros, em relação aos grupos experimentais. O conector mostra a diferença significativa ($p<0,05$).

A média dos valores da força no limite máximo (FM) nos ensaios dos fêmures (figura 16) do grupo G-III foi significativamente maior que as dos grupos G-I e G-II ($p<0,05$). Entretanto, não houve diferenças estatísticas entre os grupos G-II e G-I ($p=0,983$). Além disso, o grupo G-VI foi significativamente maior que as dos grupos G-V, G-IV ($p<0,05$).

Figura 16 - Gráficos representativos dos valores médios das forças no limite máximo dos fêmures, em relação aos grupos experimentais. Os conectores mostram as diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.3.2 Rigidez

Os valores médios da rigidez dos úmeros (figura 17) apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos G-III e G-II ($p < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos G-III e G-I ($p = 0,066$), e entre os grupos G-II e G-I ($p = 0,948$). Entre os grupos G-VI e G-V, e entre os grupos G-V e G-IV, foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$). A comparação dos grupos G-VI e G-IV não mostrou diferença estatística ($p = 0,424$).

Figura 17 - Gráficos representativos dos valores médios da rigidez dos úmeros, em relação aos grupos experimentais. Os conectores mostram as diferenças significativas ($p < 0,05$).

A média dos valores da rigidez (R) obtidos nos fêmures (figura 18) dos grupos G-I, G-II e G-III não apresentaram diferenças estatísticas ($p = 0,153$). Entre os grupos G-VI e G-V essa diferença foi significativa ($p < 0,05$). Porém, essas diferenças não foram

significantes entre os grupos G-VI e G-IV ($p=0,191$) e entre os grupos G-V e G-IV ($p=0,634$).

Figura 18 - Gráficos representativos dos valores médios da rigidez dos fêmures, em relação aos grupos experimentais. O conector mostra a diferença significativa ($p < 0,05$).

3.4 Histomorfometria

Nos parâmetros histomorfométricos estruturais foram observados o volume trabecular (BV/TV), a espessura trabecular (Tb.Th), o número de trabéculas (Tb.N), e a separação trabecular (Tb.Sp) em todos os grupos experimentais: G-I (esquelética), G-II (tração cutânea), G-III (controle), G-IV (tração esquelética), G-V (tração cutânea) e G-VI (controle) apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros histomorfométricos avaliados nos grupos G-I suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (3 semanas), G-II suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (3 semanas), G-III grupo controle (3 semanas), G-IV suspensão pela cauda com o uso da tração esquelética (6 semanas), G-V suspensão pela cauda com o uso da tração cutânea (6 semanas), G-VI grupo controle (6 semanas).

PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS	G-I	G-II	G-III	G-IV	G-V	G-VI
Fêmur BV/TV(%)	30,04±9,70	32,25±5,05	40,62±7,76 ^Δ	29,64±5,08	28,56±6,04	40,96±9,36 [#]
Fêmur Tb.Th(μm)	89,08±13,83	92,38±14,45	124,9±28,37 [*]	81,73±10,35	83,64±13,29	124,9±23,97 [#]
Fêmur Tb.N(/mm)	3,32±0,61	3,53±0,67	3,36±0,86	3,66±0,71	3,42±0,60	3,26±0,35
Fêmur Tb.Sp(μm)	220,5±64,38	198,2±43,23	176,1±58,30	199,8±47,04	215,5±49,50	184,7±48
Úmero BV/TV(%)	38,79±9,12	37,76±5,13	41,17±8,10	38,61±5,17	35,42±4,50	46,32±6,69 ^{**}
Úmero Tb.Th(μm)	120,1±23,43	121,5±11,54	122,7±24,96	132,9±15,13	109,9±22,61	157,2±19,55 ^{**}
Úmero Tb.N(/mm)	3,22±0,30	3,10±0,33	3,40±0,74	2,90±0,23	3,28±0,45	2,94±0,24
Úmero Tb.Sp(μm)	201,2±20,48	203,1±33,77	180,8±50,24	212,7±29,47	199,0±26,78	184,2±32,53

Valores das médias e desvios padrão

*** G-III > G-II e G-I (p<0,05)**

^Δ G-III > G-I (p<0,05)

[#] G-VI > G-V e G-IV (p<0,05)

**** G-VI > G-V (p<0,05)**

Os resultados dos parâmetros histomorfométricos estruturais dos fêmures no volume trabecular (BV/TV) foi significativamente maior no grupo G-III em comparação ao grupo G-I (p<0,05). Porém, entre os grupos G-III e G-II e entre os grupos G-II e G-I não houve diferença estatística. Em relação ao grupo G-VI os resultados foram significativamente maiores, comparados aos grupos G-V e G-IV (p<0,05). Entretanto, entre os grupos G-V e G-VI não houve diferença estatística (p>0,05).

Nos resultados dos parâmetros histomorfométricos estruturais (BV/TV) dos úmeros entre os grupos G-I, G-II e G-III não houve diferença estatística (p>0,05). Em relação aos grupos G-VI e G-V o resultado foi significativamente maior no grupo G-VI (p<0,05). Porém, quando comparados os grupos G-VI e G-IV, e os grupos G-V e G-IV não houve diferença estatística (p>0,05).

Os parâmetros histomorfométricos da estrutura trabecular expressa pela espessura trabecular (Tb.Th) nos fêmures foram significativamente maiores no grupo G-III em comparação com os grupos G-I e G-II ($p<0,05$), porém, entre os grupos G-I e G-II não houve diferença estatística ($p>0,05$). Os resultados estatísticos no grupo G-VI foi significativamente maiores do que nos grupos G-V e G-IV ($p<0,05$).

Em relação aos parâmetros histomorfométricos da estrutura trabecular expressa pela espessura trabecular (Tb.Th) nos úmeros dos grupos G-I, G-II e G-III, não houve diferença estatística ($p>0,05$). No entanto, entre os grupos G-VI e G-V o resultado foi significativamente maior no grupo G-VI ($p<0,05$), e entre os grupos G-VI e G-IV, e entre os grupos G-IV e G-V não houve diferença estatística ($p>0,05$).

Outros parâmetros histomorfométricos da estrutura trabecular expressa pelo número de trabéculas (Tb.N) e pela separação trabecular (Tb.Sp) dos fêmures e úmeros não apresentaram diferença estatística entre os grupos G-I, G-II e G-III, e entre os grupos G-IV, G-V e G-VI, ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

4 Discussão

Análises de ratos enviados a bordo de naves espaciais contribuíram bastante para entender os mecanismos das adaptações musculoesqueléticas que ocorrem durante a exposição à microgravidade. Com a finalidade de facilitar e diminuir custos foram desenvolvidos modelos experimentais que simulam tais alterações, sendo a suspensão pela cauda o mais comum deles. Depois, foi verificado que esse modelo serve também para o estudo das alterações musculoesqueléticas observadas na hipoatividade (WRONSKI, MOREY-HOLTON, 1987; LEBLANC et al., 1985).

Em virtude das limitações encontradas com o clássico sistema de suspender o animal pela cauda com a tração cutânea, nesta investigação foi proposto o uso da tração esquelética para esse fim. Nossos resultados mostram que a modificação foi satisfatória, com boa tolerância dos animais e baixo índice de complicações, além de permitir a observação por períodos mais longos que três semanas, uma limitação da tração cutânea.

Mais recentemente, quando nosso experimento já se encontrava finalizado, surgiu o trabalho de FERREIRA et al., 2011 que propuseram a transfixação de fios de aço flexíveis através do disco intervertebral. Entretanto, esses autores trabalharam com camundongos que são muito mais leves que rato e, além disso, eles não referem no relato controle radiográfico para comprovação do correto posicionamento do fio de aço.

O fio de aço usado em nosso experimento é em torno de três vezes mais grosso que o usado por FERREIRA et al., 2011 e, por esta razão, precisa de um estribo. O que se sabe de trações esqueléticas usadas em ortopedia é que fios de maior espessura fixam mais e dão menos problemas de partes moles, em virtude de não deslizarem.

Concordamos com FERREIRA et al., 2011 que a tração realizada diretamente por um metal transfixando a cauda tem vantagens como permitir sempre a visualização de todo o animal, de modo que problemas sistêmicos ou locais possam ser identificados imediatamente e não ao final do período de suspensão. Em segundo lugar, os animais não se soltam da suspensão, o que pode ocorrer quando o sistema é cutâneo. Além disso, eles não roem o sistema de enfaixamento.

A aplicação do método proposto foi de fácil execução, pois a vértebra é facilmente palpável no início da cauda para aplicar o fio de Kirschner transfixante. Entre todos os animais suspensos pela tração esquelética, apenas um foi descartado, em contraposição, sete animais submetidos à tração cutânea foram desprezados.

O objetivo desta investigação tem dois aspectos. O primeiro relaciona-se à comparação da própria tolerância dos animais aos dos sistemas de tração e, o segundo, à comparação dos efeitos da hipoatividade entre os dois sistemas. Para a primeira finalidade são usados critérios clínicos e a dosagem de corticosterona. Para a segunda avaliação foram usados análise da densidade mineral óssea, ensaios mecânicos e avaliação do trabeculado ósseo pela histomorfometria.

4.1 Indicadores de estresse

Nossos critérios de avaliação clínica tiveram por base os relatos de KNOX et al., 2004. À semelhança desses autores, verificamos que todos os animais dos grupos suspensos apresentaram indicadores clínicos de estresse durante a primeira semana, verificados principalmente pelo surgimento de pigmentos de porfirina nas regiões do focinho e periorbitárias. O fato de haver desaparecimento dos pigmentos após a primeira semana indica adaptação das ratas à posição suspensa. Entretanto, após a terceira semana, os indicadores de estresse começaram a reaparecer no grupo por tração

cutânea e foram clinicamente associados a complicações no sistema de tração constatados por lesões cutâneas que devem ter provocado dor. Por esta razão os animais foram sacrificados e o resultado computado como falha do método.

Outro fator de avaliação foi o peso corpóreo, que, em nossos resultados, foi crescente e sem diferença estatística em todos os grupos. Este fato deveu-se, provavelmente, a correção da ingestão de ração nos grupos controles. Assim, outras causas mencionadas por outros autores como compensação do peso por aumento da massa adiposa (WADE et al., 2002) ou hipotrofia muscular (CORNACHIONE et al., 2008) parece não ter sido importante em nossos animais.

Outro indicador de estresse que utilizamos foram os níveis de corticosterona plasmática. KNOX et al., 2004 dosaram corticosterona fecal e, com isso puderam fazer uma avaliação mais continuada da variação. Vários autores também fizeram a correlação de níveis de corticosterona e verificaram que após uma semana de suspensão há retorno aos níveis basais (HALLORAN et al., 1988; STEFFEN, MUSACCHIA, 1987; MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002). Como estávamos interessados na comparação de dois sistemas estabelecemos um limite de três semanas para a comparação da corticosterona, pois ele se afasta do período de estresse inicial e coincide com um período crítico da tração cutânea. Verificamos que, também, não houve diferença entre os grupos suspensos, ou seja, a tração esquelética não acrescentou estresse adicional.

4.2 Avaliação dos efeitos da suspensão sobre o osso

Os efeitos da suspensão sobre a qualidade óssea foi avaliada pela densitometria, resistência mecânica e pela histomorfometria. Estes métodos se completam e devem ser

feitos associadamente, pois cada um expressa vários aspectos do osso: a porção mineral, a parte funcional e a parte orgânica (SCOTT et al., 2008; DONNELLY, 2011).

A utilização dos úmeros atua como um auto-controle, pois estando os animais em uso dos membros anteriores para locomoção, os efeitos da hipoatividade não foram muito marcantes nos úmeros.

A densidade mineral óssea (DMO) é um dos principais parâmetros para determinar a influência da hipoatividade e das atividades diárias sobre o tecido ósseo. A suspensão dos animais pela cauda pelos dois métodos causou diminuição significativa da DMO dos fêmures. Trabalhos que utilizaram o método de suspensão de ratos pela cauda apresentaram resultados semelhantes aos nossos. JU et al., 2008 compararam a DMO em fêmures de ratos após 14 dias de suspensão, os valores da DMO foram significativamente menores do que os encontrados nos animais do grupo controle sem intervenção.

No estudo de VICO et al., 1995 que analisou as mudanças que ocorrem em ossos de ratos após serem submetidos a suspensão, também houve diminuição significativa da DMO dos animais que permaneceram em suspensão, além disso, não houve diferença significativa entre os úmeros de ratos que foram suspensos em relação aos animais do grupo controle sem intervenção.

Segundo MOREY-HOLTON, GLOBUS, 2002, um bom modelo que simule a microgravidade deve induzir alterações do mecanismo fisiológico e celular do tecido ósseo em resposta à ausência de carga sobre os membros. Além disso, a redução da carga mecânica que ocorre durante a suspensão dos animais gera baixos estresses e tensão sobre o tecido ósseo que são necessários para manter a integridade estrutural do esqueleto.

A maioria das investigações sobre as propriedades mecânicas dos ossos é realizada em experimentos em que os ossos são testados em ensaios mecânicos com aplicações de carga em compressão, flexão, torção e flexocompressão. Os resultados encontrados nesses experimentos consistem em valores da força no limite máximo (FM) e da rigidez (R) (SHARIR et al., 2008). Por meio dos ensaios mecânicos conseguimos obter resultados que demonstraram a eficiência do modelo experimental como um importante indicador de enfraquecimento ósseo.

De acordo com GARBER et al., 2000, após realizarem ensaios mecânicos em fêmures de ratos submetidos ao modelo de suspensão descritos por WRONSKI, MOREY-HOLTON, 1987, ocorreu diminuição significativa da força do limite máximo comparada com a do grupo controle, resultados esses, semelhantes aos do nosso estudo, em que, após três ou mais semanas de suspensão, os fêmures apresentaram diminuição significativa da força no limite máximo.

Os resultados da força no limite máximo dos úmeros mostraram que a suspensão por três e seis semanas não provocaram mudanças importantes da resistência do úmero, resultado também encontrado por BLOOMFIELD et al., 2002. Além disso, os resultados dos ensaios mecânicos encontrados nos valores médios dos fêmures coincidiram com estudos anteriores (SHAW et al., 1987; SHIMANO, VOLPON, 2009).

O exame histomorfométrico é bastante utilizado para quantificar os parâmetros estruturais microscópios do osso. A utilização dessa ferramenta foi fundamental para determinar as alterações causadas pela suspensão no tecido ósseo em nível microscópico, pois reduções crônicas na carga mecânica, levam à perda do tecido ósseo, principalmente daqueles que, normalmente, suportam carga. Em situações de hipoatividade o esqueleto parece reconhecer que não precisa de toda sua massa para manter a integridade estrutural e funcional e, como resultado, há a osteopenia,

representada pela diminuição de todo o tecido ósseo. Clinicamente, este problema pode ser importante, pois pode levar a ocorrência de fraturas em períodos de convalescença (SCOTT et al., 2008; GIANREGORIO, MCCARTNEY, 2006).

A diminuição do volume trabecular e da espessura trabecular encontrados nos fêmures dos grupos suspensos pela cauda coincidiram com estudos anteriores que utilizaram a técnica de suspensão (JU et al., 2008; LANG et al., 2004; SMITH et al., 2005). Como esperado, essa diminuição não foi encontrada nos úmeros, resultados semelhantes aos de BAROU et al., 1999. Estes resultados também são semelhantes aos encontrados em ratos submetidos a voos espaciais (WRONSKI et al., 1980; WRONSKI et al., 1987).

Um aspecto interessante de nossos resultados foi que, aumentado o período de suspensão além de três semanas, não houve piora correspondente da qualidade óssea, o que faz supor que esse limite de tempo seja o ideal para estudos com osteopenia, sem correr o risco de muitas complicações com os animais. Assim, períodos maiores de suspensão podem ser empregados quando se tem outra finalidade, como testes terapêuticos após o estabelecimento da osteopenia.

A mecanobiologia é parte da ciência que estuda as interações mecânicas e os fenômenos biológicos e encontra várias aplicações no sistema musculoesquelético. A interação entre atividade física e estímulos mecânicos no osso parecem ser mediadas pelo efeito piezelétrico que é o surgimento de cargas elétricas conforme o tipo de deformação do osso (FUKADA, YASUDA, 1957). De acordo com a revisão de DE GUSMÃO, BELANGERO, 2009, esse efeito, em termos celulares é mediado pela ativação dos canais iônicos, principalmente os de cálcio e potássio. Essa ativação induz o fluxo iônico na célula óssea, que, por sua vez, identifica as características do estímulo mecânico e responde eletrofisiologicamente com maior ativação dos canais iônicos,

resultando em alterações da polarização. A hiperpolarização está associada à osteogênese e a despolarização da membrana plasmática causada pela hipoatividade é associada à reabsorção óssea.

Além disso, as diminuições significativas do tecido ósseo podem ter ocorrido por meio da mecanotransdução, pois, segundo DE GUSMÃO, BELANGERO, 2009; BUTCHER et al., 2008; SCOTT et al., 2008; YOKOTA, TANAKA, 2005, acredita-se que a ativação de canais iônicos transmite, bioquimicamente, a deformação mecânica para osteócitos vizinhos, osteoblastos e osteoclastos. Essa reação bioquímica a partir de um estímulo mecânico pode ser definida como uma mecanotransdução. As reações bioquímicas atuam em nível celular e podem causar inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, alteração na migração celular, entre outros efeitos. Do mesmo modo, pode-se determinar que uma diminuição ou ausência desse estímulo mecânico não desencadearia essa cascata de eventos.

CONCLUSÕES

5 Conclusões

O sistema de tração esquelética foi mais eficiente para manter os animais suspensos até seis semanas do que o sistema de tração cutânea, mas não houve diferença entre os parâmetros clínicos para estresse em relação ao sistema convencional de tração cutânea. Ambos os métodos causaram enfraquecimento ósseo (fêmures) de maneira semelhante, em relação ao grupo controle.

A manutenção de animais por períodos maiores que três semanas não produziu aumento correspondente do estado osteopênico.

REFERÊNCIAS

6 Referências bibliográficas

- AZUMA, Y., OUE, Y., KANATANI, H., OHTA, T., KIYOKI, M., KOMORIYA, K. Effects of continuous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: comparison with pamidronate and etidronate in growing rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 286, n. 1, p. 128-35, July, 1998.
- BAROU, O., LAFAGE-PROUST, M. H., MARTEL, C., THOMAS, T., TIRODE, F., LAROCHE, N., BARBIER, A., ALEXANDRE, C., VICO, L. Bisphosphonate effects in rat unloaded hindlimb bone loss model: three-dimensional microcomputed tomographic, histomorphometric, and densitometric analyses. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 291, n. 1, p. 321-8, Oct., 1999.
- BATCH, J. A., COUPER, J. J., RODDA, C., COWELL, C. T., ZACHARIN, M. Use of bisphosphonate therapy for osteoporosis in childhood and adolescence. **J. Paediatr. Child Health.**, 39, n. 2, p. 88-92, Mar., 2003.
- BIKLE, D. D., HALLORAN, B. P. The response of bone to unloading. **J. Bone Miner. Metab.**, 17, n. 4, p. 233-44, Feb., 1999.
- 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**, 31, n. 1, p. 149-57, July, 2002.
- BONE, H. G., SCHURR, W. Intravenous bisphosphonate therapy for osteoporosis: where do we stand? **Curr. Osteoporos. Rep.**, 2, n. 1, p. 24-30, Mar., 2004.
- BUFFELLI, M., PASINO, E., CANGIANO, A. Paralysis of rat skeletal muscle equally affects contractile properties as does permanent denervation. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, 18, n. 6, p. 683-95, Dec., 1997.
- BUTCHER, M. T., ESPINOZA, N. R., CIRILO, S. R., BLOB, R. W. In vivo strains in the femur of river cooter turtles (*Pseudemys concinna*) during terrestrial locomotion: tests of force-platform models of loading mechanics. **J. Exp. Biol.**, 211, n. 15, p. 2397-407, Aug., 2008.
- CAVANAGH, P. R., LICATA, A. A., RICE, A. J. Exercise and pharmacological countermeasures for bone loss during long-duration space flight. **Gravit. Space Biol. Bull.**, 18, n. 2, p. 39-58, June, 2005.
- 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. **J. Appl. Physiol.**, 89, n. 3, p. 1046-54, Sept., 2000.
- CORNACHIONE, A., CACAO-BENEDINI, L. O., SHIMANO, M. M., VOLPON, J. B., MARTINEZ, E. Z., MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological comparison of

different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. **Scand. J. Med. Sci. Sports.**, 18, n. 4, p. 453-61, Aug., 2008.

DE GUSMÃO, C. V. B., BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Rev. Bras. Ortop.**, 44, n. 4, p. 299-305, 2009.

DONNELLY, E. Methods for assessing bone quality: a review. **Clin. Orthop. Relat Res.**, 469, n. 8, p. 2128-38, Aug., 2011.

FERREIRA, J. A., CRISSEY, J. M., BROWN, M. An alternant method to the traditional NASA hindlimb unloading model in mice. **J. Vis. Exp.**, 49, p. 2011.

FUKADA, E., YASUDA, I. On the piezoelectric effect of bone. **J. Phys. Soc. Jpn.**, 12, n. 10, p. 1158-62, 1957.

GARBER, M. A., MCDOWELL, D. L., HUTTON, W. C. Bone loss during simulated weightlessness: a biomechanical and mineralization study in the rat model. **Aviat. Space Environ. Med.**, 71, n. 6, p. 586-92, June, 2000.

GARDNER, E., GRAY, D.J., O'RAHILLY, R. **Esqueleto**. In Anatomia: estudo regional do corpo humano. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1967, p. 11-21.

GIANGREGORIO, L., MCCARTNEY, N. Bone loss and muscle atrophy in spinal cord injury: epidemiology, fracture prediction, and rehabilitation strategies. **J. Spinal Cord. Med.**, 29, n. 5, p. 489-500, 2006.

GIGO-BENATO, D., RUSSO, T. L., GEUNA, S., DOMINGUES, N. R., SALVINI, T. F., PARIZOTTO, N. A. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. **Muscle Nerve**, 41, n. 5, p. 685-93, May, 2010.

GLOBUS, R. K., BIKLE, D. D., MOREYHOLTON, E. Effects of simulated weightlessness on bone-mineral metabolism. **Endocrinology**, 114, n. 6, p. 2264-70, Oct., 1984.

GUYTON, A.C. **Hormônio paratireóideo, calcitonina, metabolismo do cálcio e do fósforo, vitamina D, ossos e dentes**. In Fisiologia Médica. Guanabara Koogan, São Paulo, 1992, p. 765-779.

HALLORAN, B. P., BIKLE, D. D., CONE, C. M., MOREY-HOLTON, E. Glucocorticoids and inhibition of bone formation induced by skeletal unloading. **Am. J. Physiol.**, 255, n. 6 Pt 1, p. E875-E879, Dec., 1988.

HEFFERAN, T. E., EVANS, G. L., LOTINUN, S., ZHANG, M., MOREY-HOLTON, E., TURNER, R. T. Effect of gender on bone turnover in adult rats during simulated weightlessness. **J. Appl. Physiol.**, 95, n. 5, p. 1775-80, Nov., 2003.

IANNETTA, O. **Classificação da osteoporose**. In Osteoporose: uma ex-enfermidade silenciosa. Tecmedd, Ribeirão Preto, SP, 2006a, p. 34-35.

IANNETTA, O. **Introdução à osteoporose**. In Osteoporose: uma ex-enfermidade silenciosa. Tecmedd, Ribeirão Preto, SP, 2006b, p. 31-33.

JASPERS, S. R., TISCHLER, M. E. Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. **J. Appl. Physiol.**, 57, n. 5, p. 1472-9, Nov., 1984.

JAWORSKI, Z. F., LISKOVA-KIAR, M., UHTHOFF, H. K. Effect of long-term immobilisation on the pattern of bone loss in older dogs. **J. Bone Joint Surg. Br.**, 62-B, n. 1, p. 104-10, Feb., 1980.

JEE, W. S. S., WRONSKI, T. J., MOREY, E. R., KIMMEL, D. B. Effects of spaceflight on trabecular bone in rats. **Am. J. Physiol.**, 244, n. 3, p. R310-R314, 1983.

JU, Y. I., SONE, T., OKAMOTO, T., FUKUNAGA, M. Jump exercise during remobilization restores integrity of the trabecular architecture after tail suspension in young rats. **J. Appl. Physiol.**, 104, n. 6, p. 1594-600, June, 2008.

KASPER, C. E., MCNULTY, A. L., OTTO, A. J., THOMAS, D. P. Alterations in skeletal-muscle related to impaired physical mobility - an empirical-model. **Res. Nurs. Health.**, 16, n. 4, p. 265-73, Aug., 1993.

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. **Aviat. Space Environ. Med.**, 75, n. 8, p. 692-6, Aug., 2004.

LANG, T., LEBLANC, A., EVANS, H., LU, Y., GENANT, H., YU, A. Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight. **J. Bone Miner. Res.**, 19, n. 6, p. 1006-12, June, 2004.

LEBLANC, A., MARSH, C., EVANS, H., JOHNSON, P., SCHNEIDER, V., JHINGRAN, S. Bone and muscle atrophy with suspension of the rat. **J. Appl. Physiol.**, 58, n. 5, p. 1669-75, May, 1985.

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

MATSUURA, T., IKATA, T., TAKATA, S., KASHIWAGUCHI, S., NIWA, M., SOGABE, T., KOGA, K. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, 91, n. 5, p. 2334-41, July, 2001.

MILANI, J. G. P. O., MATHEUS, J. P. C., GOMIDE, L. B., VOLPON, J. B., SHIMANO, A. C. Biomechanical effects of immobilization and rehabilitation on the

skeletal muscle of trained and sedentary rats. **Ann. Biomed. Eng.**, 36, n. 10, p. 1641-8, Oct., 2008.

MOREY, E. R. Spaceflight and bone turnover - correlation with a new rat model of weightlessness. **Bioscience**, 29, n. 3, p. 168-72, Mar., 1979.

MOREY-HOLTON, E. R., GLOBUS, R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. **J. Appl. Physiol.**, 92, n. 4, p. 1367-77, Apr., 2002.

MOREY-HOLTON, E. R., GLOBUS, R. K. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. **Bone**, 22, n. 5 Suppl, p. 83S-8S, May, 1998.

MORSE, L., TENG, Y. D., PHAM, L., NEWTON, K., YU, D., LIAO, W. L., KOHLER, T., MULLER, R., GRAVES, D., STASHENKO, P., BATTAGLINO, R. Spinal cord injury causes rapid osteoclastic resorption and growth plate abnormalities in growing rats (SCI-induced bone loss in growing rats). **Osteoporos. Int.**, 19, n. 5, p. 645-52, May, 2008.

MUSACCHIA, X. J., DEAVERS, D. R. A new rat model for studies of hypokinesia and antiorthostasis. **Physiologist.**, 23, n. Suppl 6, p. S91-S92, Dec., 1980.

NEW, S. A., ROBINS, S. P., CAMPBELL, M. K., MARTIN, J. C., GARTON, M. J., BOLTON-SMITH, C., GRUBB, D. A., LEE, S. J., REID, D. M. Dietary influences on bone mass and bone metabolism: further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health? **Am. J Clin. Nutr.**, 71, n. 1, p. 142-51, Jan., 2000.

NIELSEN, F. H., MILNE, D. B. A moderately high intake compared to a low intake of zinc depresses magnesium balance and alters indices of bone turnover in postmenopausal women. **Eur. J Clin. Nutr.**, 58, n. 5, p. 703-10, May, 2004.

NORDIN, B. E. C. Skeletal metabolism. **Acta. Orthop. Scand.**, 54, n. 3, p. 482, 1983.

NORMAN, T. L., BRADLEY-POPOVICH, G., CLOVIS, N., CUTLIP, R. G., BRYNER, R. W. Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviat. Space Environ. Med.**, 71, n. 6, p. 593-8, June, 2000.

OHIRA, Y., KAWANO, F., WANG, X. D., SUDOH, M., IWASHITA, Y., MAJIMA, H. J., NONAKA, I. Irreversible morphological changes in leg bone following chronic gravitational unloading of growing rats. **Life Sci.**, 79, n. 7, p. 686-94, July, 2006.

PARFITT, A. M., DREZNER, M. K., GLORIEUX, F. H., KANIS, J. A., MALLUCHE, H., MEUNIER, P. J., OTT, S. M., RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. **J. Bone Miner. Res.**, 2, n. 6, p. 595-610, Dec., 1987.

ROY, R. R., ZHONG, H., KHALILI, N., KIM, S. J., HIGUCHI, N., MONTI, R. J., GROSSMAN, E., HODGSON, J. A., EDGERTRON, V. R. Is spinal cord isolation a good model of muscle disuse? **Muscle Nerve**, 35, n. 3, p. 312-21, Mar., 2007.

SCOTT, A., KHAN, K. M., DURONIO, V., HART, D. A. Mechanotransduction in human bone in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. **Sports Med.**, 38, n. 2, p. 139-60, 2008.

SEEDOR, J. G., QUARTUCCIO, H. A., THOMPSON, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **J. Bone Miner. Res.**, 6, n. 4, p. 339-46, Apr., 1991.

SHARIR, A., BARAK, M. M., SHAHAR, R. Whole bone mechanics and mechanical testing. **Vet. J.**, 177, n. 1, p. 8-17, July, 2008.

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. **J. Biomech.**, 20, n. 3, p. 225-34, 1987.

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

SHIMANO, M. M., VOLPON, J. B. Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 42, n. 4, p. 330-8, Apr., 2009.

SIMÕES, P. A., ZAMARIOLI, A., BLOES, P., MAZZOCATO, F. C., PEREIRA, L. H. A., VOLPON, J. B., SHIMANO, A. C. Effect of treadmill exercise on lumbar vertebrae in ovariectomized rats: anthropometrical and mechanical analyses. **Acta Bioeng. Biomech.**, 10, n. 2, p. 39-41, 2008.

SMITH, B. J., LUCAS, E. A., TURNER, R. T., EVANS, G. L., LERNER, M. R., BRACKETT, D. J., STOECKER, B. J., ARJMANDI, B. H. Vitamin E provides protection for bone in mature hindlimb unloaded male rats. **Calcif. Tissue Int.**, 76, n. 4, p. 272-9, Apr., 2005.

STEFFEN, J. M., MUSACCHIA, X. J. Disuse atrophy, plasma corticosterone, and muscle glucocorticoid receptor levels. **Aviat. Space Environ. Med.**, 58, n. 10, p. 996-1000, Oct., 1987.

THOMPSON, D. D., SEEDOR, J. G., WEINREB, M., ROSINI, S., RODAN, G. A. Aminohydroxybutane bisphosphonate inhibits bone loss due to immobilization in rats. **J. Bone Miner. Res.**, 5, n. 3, p. 279-86, Mar., 1990.

THOMPSON, D. D., SIMMONS, H. A., PIRIE, C. M., KE, H. Z. Fda guidelines and animal-models for osteoporosis. **Bone**, 17, n. 4, p. S125-S133, Oct., 1995.

TOU, J. C., FOLEY, A., YUAN, Y. V., ARNAUD, S., WADE, C. E., BROWN, M. The effect of ovariectomy combined with hindlimb unloading and reloading on the long bones of mature Sprague-Dawley rats. **Menopause-J. N. Am. Menopause Soc.**, 15, n. 3, p. 494-502, May, 2008.

TURNER, C. H. Bone strength: current concepts. **Ann. N. Y Acad. Sci.**, 1068, n. 429-46, Apr., 2006.

TURNER, R. T. What do we know about the effects of spaceflight on bone? **J. Appl. Physiol.**, 89, n. 2, p. 840-7, Aug., 2000.

VECSEI, P. Glucocorticoids: corticosterone and compounds. In Jaffe, M (ed) methods of hormone radioimmunoassay. **Academic Press.**, 767-92, 1979.

VICO, L., BOURRIN, S., VERY, J. M., RADZISZOWSKA, M., COLLET, P., ALEXANDRE, C. Bone changes in 6-mo-old rats after head-down suspension and a reambulation period. **J. Appl. Physiol.**, 79, n. 5, p. 1426-33, Nov., 1995.

VICO, L., COLLET, P., GUIGNANDON, A., LAFAGE-PROUST, M. H., THOMAS, T., REHAILLIA, M., ALEXANDRE, C. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. **Lancet.**, 355, n. 9215, p. 1607-11, May, 2000.

VOLPON, J. B., CECIM, P. E. S., MIYASE, C. I., GAVA, N. F. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. **Rev. Bras. Ortop.**, 43, n. 10, p. 448-51, Oct., 2008.

WADE, C. E., MILLER, M. M., BAER, L. A., MORAN, M. M., STEELE, M. K., STEIN, T. P. Body mass, energy intake, and water consumption of rats and humans during space flight. **Nutrition.**, 18, n. 10, p. 829-36, Oct., 2002.

WIDRICK, J. J., MADDALOZZO, G. F., HU, H., HERRON, J. C., IWANIEC, U. T., TURNER, R. T. Detrimental effects of reloading recovery on force, shortening velocity, and power of soleus muscles from hindlimb-unloaded rats. **Am. J. Physiol. -Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 295, n. 5, p. R1585-R1592, Nov., 2008.

WINIARSKI, A. M., ROY, R. R., ALFORD, E. K., CHIANG, P. C., EDGERTON, V. R. Mechanical properties of rat skeletal muscle after hind limb suspension. **Exp. Neurol.**, 96, n. 3, p. 650-60, June, 1987.

WRONSKI, T. J., MOREY, E. R. Effect of spaceflight on periosteal bone-formation in rats. **Am. J. Physiol.**, 244, n. 3, p. R305-R309, Feb., 1983.

WRONSKI, T. J., MOREY-HOLTON, E., JEE, W. S. Cosmos 1129: spaceflight and bone changes. **Physiologist.**, 23, n. Suppl 6, p. S79-S82, Dec., 1980.

WRONSKI, T. J., MOREY-HOLTON, E. R. Skeletal response to simulated weightlessness - a comparison of suspension techniques. **Aviat Space Environ Med.**, 58, n. 1, p. 63-8, Jan., 1987.

WRONSKI, T. J., MOREYHOLTON, E. R., DOTY, S. B., MAESE, A. C., WALSH, C. C. Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. **Am. J. Physiol.**, 252, n. 2, p. R252-R255, Feb., 1987.

YOKOTA, H., TANAKA, S. M. Osteogenic potentials with joint-loading modality. **J. Bone Miner. Metab.**, 23, n. 4, p. 302-8, July, 2005.

ZARROW, M. X., YOCHIM, J. M., MCCARTHY, J. L., SANBORN, R. C. Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques. **Academic Press.**, 10, n. 2, p. 39-40, Feb., 1964.

Anexo

Anexo 1 - Cópia do protocolo de aprovação do trabalho pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 063/2009, sobre o projeto intitulado "*Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Batista Volpon** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **27 de abril de 2009**.

(We certify that the protocol nº 063/2009, about "*Development of a modified system of tail suspension of the rat as a model of osteopenia*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in 04/27/2009 meeting.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2009.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal