ANÁLISE DE UM MODELO DO PROCESSO DE INSTALAÇÃO DE OSTEOPENIA EM OSSOS CORTICAIS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Tatiana Gaion Malosso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia / Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

SÃO CARLOS

2004

Agradecimentos

A Deus, por mais esta oportunidade de crescimento e conquista.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, pela confiança e ajuda durante a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, José Aparecido e Neusa, pelo amor, paciência, compreensão, apoio e incentivo em todas as fases da minha vida, por todos os meus sorrisos e, principalmente, por terem me ensinado muito mais do que pude perceber.

Às minhas irmãs, Milena e Camila, por sempre estarem presentes e participarem dos momentos importantes da minha vida.

A pequena grande amiga Elizete, pelo exemplo de determinação, humildade e pessoa forte que é, agradeço pelo entusiasmo, companheirismo, ajuda e aprendizagem tanto na realização deste trabalho, como em minha vida pessoal.

Ao meu grande amigo Nelson, pelos risos, carinho, confiança, ajuda, incentivo e amizade dedicados a mim, assim como pelo profissionalismo e assistência na realização e elaboração deste estudo.

Às amigas Lu, Laine, Cássia e Kinda, pelas palavras sábias e de confiança, pelo incentivo e amizade em todos os momentos da minha vida e, principalmente, por me deixar fazer parte de suas famílias.

Às amigas Adriana e Kátia, por toda amizade e incentivo.

Aos meus amigos, Ana Paula, Karina Nogueira e Odilon, pela amizade, paciência e estímulo durante estes sete anos de convivência, e Karina Say e Ana Cláudia, pela amizade e todos os risos.

A equipe da Top Idiomas, pela convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, para o qual deixo aqui expressa minha grande admiração como pessoa compreensiva, atenciosa e humana que é.

Aos Profs. Drs. João Manuel Domingos de Almeida Rollo e Orivaldo Lopes da Silva, pelo apoio, incentivo e atenção a mim dispensados.

Às secretárias da Bioengenharia de São Carlos, Janete e Melaine, pela dedicação prestada no atendimento à minha pessoa.

Aos funcionários da Bioengenharia de Ribeirão Preto, Maria Teresinha, Francisco e Luiz Henrique, pelos auxílios prestados durante a realização deste trabalho.

A todos os professores do programa e às pessoas que, de uma forma ou outra, ajudaram-me na realização desta pesquisa.

E aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de alegria, amizade e convivência.

RESUMO

MALOSSO, T.G. (2004). *Análise de um modelo do quadro de instalação de osteopenia em ossos corticais de ratas ovariectomizadas*, São Carlos, 2004. 81p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A osteoporose é um enfraquecimento progressivo dos ossos, que ficam cada vez mais sujeitos a fraturas. Embora possa acometer ambos os sexos, ela é mais freqüente nas mulheres após a menopausa devido à diminuição dos hormônios femininos, os estrógenos. É uma doença que avança lentamente, sem sintomas, geralmente sem ser percebida até que aconteça uma fratura. Uma vez instalada a osteoporose, tem que se evitar maior perda óssea para prevenir fraturas. O objetivo deste trabalho é analisar o quadro de instalação de osteopenia em ossos corticais de ratas ovariectomizadas. Foi utilizado um modelo de osteopenia em 29 ratas *Wistar* ovariectomizadas com massa corpórea de 250 gramas. Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais e eutanaziados em períodos diferentes: o primeiro grupo foi eutanaziado 30 dias após a cirurgia, que corresponde ao tempo de início da osteopenia, e a partir daí, os demais grupos foram eutanaziados numa seqüência de 15 dias até o 105º dia. A avaliação do quadro de instalação foi realizada através de medidas antropométricas e de propriedades mecânicas dos fêmures (ensaio de flexão de três pontos). Cada um dos itens obtidos foram comparados utilizando-se o programa GraphPad InStat 3. O teste *t-Student* foi aplicado para checar a variação do peso corporal com $p < 0,05$. Aplicaram-se os testes ANOVA e *Student-Newman-Keuls* com coeficiente de variação também menor que 5% para os demais itens analisados. Observou-se um aumento significativo no comprimento dos fêmures durante o primeiro mês de experimento, assim como na carga máxima aplicada. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a ovariectomia é um fator que não causa grandes alterações mecânicas e geométricas na região cortical dos fêmures de ratas no período analisado.

Palavras-chave: fêmur, osso cortical, osteopenia, ovariectomia, rata.

ABSTRACT

MALOSSO, T.G. (2004). *Analysis of a model of osteopenia installation process in cortical bones of ovariectomized rats*, São Carlos, 2004. 81p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Osteoporosis is a progressive weakness of bones, which are more and more subjects to fractures. Although it happens to men and women, it is more frequent in postmenopausal women due to a decrease of female hormones. It is a disease without symptoms and it is usually noticed only after a fracture. Once the osteoporosis is installed, a bigger bone loss must be avoided in order to prevent a fracture. This study aims to analyze the osteopenia installation process in cortical bones of ovariectomized rats. An osteopenia model was used in 29 ovariectomized Wistar female rats with body weight of 250 g. Animals were divided in 6 experimental groups, the first group was sacrificed 30 days after the surgery and, the other groups, every 15 days on until the 105th day. The evaluation of installation process was made through anthropometrics and mechanical proprieties of femur (three-point bending test). Program GraphPad InStat 3 was used in order to compare the observed items. T-student test was used to check the body weight variation with $p < 0,05$ and tests ANOVA and Student-Newman-Keuls were applied to the other items ($p < 0,05$). A significant increase in femur length and in maximum bending load were obtained. The found results in this research suggest that ovariectomy is a factor that does not cause significant mechanical and geometric alterations on cortical region of femurs in female rats during the analyzed period.

Key-words: femur, cortical bone, osteopenia, ovariectomy, female rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Pico de massa óssea.....	16
FIGURA 2 –	Esquema ilustrativo do processo de remodelamento no osso trabecular.....	18
FIGURA 3 –	Osteoblasto e osteoclasto.....	18
FIGURA 4 –	Osteoblasto e osteócito.....	18
FIGURA 5 –	Tipos de tecido ósseo e sua organização.....	19
FIGURA 6 –	Representação do osso cortical e trabecular.....	20
FIGURA 7 –	Ilustração do processo de remodelamento após a menopausa.....	22
FIGURA 8 –	Diferentes configurações de curva tensão x deformação dependentes da velocidade de carregamento.....	23
FIGURA 9 –	Desenho esquemático ilustrando os três tipos básicos de carregamento: tração, compressão e cisalhamento.....	24
FIGURA 10 –	Ensaio de flexão de três pontos.....	25
FIGURA 11 –	Gráfico carga x deflexão, a partir do qual são obtidas as principais propriedades mecânicas do ensaio de flexão.....	26
FIGURA 12 –	Curva de peso corpóreo de animais machos e fêmeas da raça <i>Wistar</i> em função da idade	29
FIGURA 13 –	Curva da carga aplicada em fêmures de animais machos e fêmeas da raça <i>Wistar</i> em função da idade	29
FIGURA 14 –	Curva do comprimento dos fêmures de animais machos e fêmeas da raça <i>Wistar</i> em função da idade	30
FIGURA 15 –	Curva da deflexão da carga aplicada em fêmures de animais machos e fêmeas da raça <i>Wistar</i> em função da idade.....	30
FIGURA 16 –	Esquema ilustrativo de alguns fatores que interferem no aparecimento da osteoporose.....	32
FIGURA 17 –	Ilustração de (A)Osso sadio; (B)Osso osteoporótico.....	32

FIGURA 18 – Reabsorção na região endosteal compensada pelo crescimento periosteal.....	36
FIGURA 19 – Incisão transversal.....	39
FIGURA 20 – Evisceração do corpo ovariano.....	39
FIGURA 21 – Excisão dos ovários.....	39
FIGURA 22 – Sutura e desinfecção.....	39
FIGURA 23 – Relógio comparador MITUTOYO® (para medida da flecha) e célula de carga KRATOS® com capacidade de 50Kg.....	41
FIGURA 24 – (A) Base de apoio com L=20mm e (B) acessório para aplicação da carga (F)	41
FIGURA 25 – Amostra de fêmures fraturados e não fraturados após o ensaio de flexão.....	42
FIGURA 26 – Exemplo de uma curva carga aplicada x deflexão obtida no programa Origin 4.1® para um fêmur ensaiado 60 dias após a ovariectomia.....	43
FIGURA 27 – Amostra da área da secção transversal em três diferentes posições e três diferentes valores de distância para a linha neutra	44
FIGURA 28 – Ilustração do posicionamento das amostras a serem escaneadas.....	45
FIGURA 29 – Amostra com posicionamento padronizado no programa AutoCAD R14®, para cálculo área transversal, momento de inércia e linha neutra.....	45
FIGURA 30 – Exemplo de uma curva tensão x deflexão obtida no programa Origin 4.1. para um fêmur ensaiado 60 dias após a ovariectomia.....	46
FIGURA 31 – Placa de aço inoxidável com 5 furos de 5mm cada cedida pelo Departamento de Engenharia de Materiais da EESC – USP	47

FIGURA 32 –	Imagens das secções transversais dos fêmures escaneadas e divididas nos 6 grupos e as respectivas identificações para cada um dos cinco animais.....	48
FIGURA 33 –	Valor médio do peso corporal inicial e final de cada grupo experimental.....	51
FIGURA 34 –	Valor médio do peso dos fêmures de cada grupo experimental	52
FIGURA 35 –	Valor médio do comprimento dos fêmures de cada grupo experimental.....	53
FIGURA 36 –	Valor médio da área da secção transversal dos fêmures de cada grupo experimental.....	54
FIGURA 37 –	Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 30 dias após a OVX.....	55
FIGURA 38 –	Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 45 dias após a OVX.	55
FIGURA 39 –	Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 60 dias após a OVX.	56
FIGURA 40 –	Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 75 dias após a OVX.	56
FIGURA 41 –	Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 90 dias após a OVX.....	57
FIGURA 42 –	Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 105 dias após a OVX.....	57
FIGURA 43 –	Valor médio da carga máxima aplicada sobre os fêmures de cada grupo experimental.....	58
FIGURA 44 –	Valor médio da deflexão máxima dos fêmures de cada grupo experimental.....	59
FIGURA 45 –	Valor médio da rigidez dos fêmures de cada grupo experimental.....	60
FIGURA 46 –	Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 30 dias após a OVX	61

FIGURA 47 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 45 dias após a OVX.....	61
FIGURA 48 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 60 dias após a OVX.....	62
FIGURA 49 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 75 dias após a OVX.....	62
FIGURA 50 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 90 dias após a OVX.....	63
FIGURA 51 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 105 dias após a OVX.....	63
FIGURA 52 – Valor médio da tensão.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Definição do estado ósseo de acordo com o valor da densidade mineral óssea (segundo a OMS).....	33
TABELA 2 -	Divisão dos grupos, dias de sacrifício após a cirurgia número de animais em cada grupo.....	40
TABELA 3 -	Valor médio e desvio padrão do peso corporal inicial e final e respectivo valor de p de cada grupo experimental.....	51
TABELA 4 -	Valor médio e desvio padrão do peso das amostras de cada grupo experimental.....	52
TABELA 5 -	Valor médio e desvio padrão do comprimento das amostras de cada grupo experimental.....	53
TABELA 6 -	Valor médio e desvio padrão da área da secção transversal das amostras de cada grupo experimental.....	54
TABELA 7 -	Valor médio e desvio padrão para carga máxima aplicada sobre as amostras em cada grupo experimental.....	58
TABELA 8 -	Valor médio e desvio padrão da deflexão máxima sobre as amostras em cada grupo experimental.....	59
TABELA 9 -	Valor médio e desvio padrão da rigidez das amostras em cada grupo experimental.....	60
TABELA 10 -	Valor médio e desvio padrão da tensão dos fêmures em cada grupo experimental.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

USP	– Universidade de São Paulo
EESC	– Escola de Engenharia de São Carlos
FMRP	– Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IQSC	– Instituto de Química de São Carlos
BMD	– Bone Mineral Density
c	– Distância da Linha Neutra até o ponto de aplicação da carga
F	– Força Aplicada
I	– Momento de Inércia
M	– Momento Fletor
L	– Distância entre os apoios
OVX	– Ovariectomia
σ	– Tensão

LISTA DE SÍMBOLOS

g	– Grama
m	– Metro
cm	– Centímetro
mm	– Milímetro
mm ²	– Milímetro ao quadrado (Unidade de medida da área)
mm ⁴	– Milímetro à quarta (Unidade de medida do momento de inércia)
MPa	– Mega Pascal
N	– Newton
N/m	– Newton por metro
°C	– Grau centígrados (Celsius)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Pico de Massa Óssea	16
1.2 Remodelamento e Crescimento Ósseo	17
1.3 Tipos de Ossos	19
1.4 Propriedades Mecânicas do Osso	22
1.5 Ensaios Mecânicos	24
1.5.1 Ensaio de Flexão	25
1.6 Influência da Idade no Comportamento Mecânico do Osso	28
1.7 Osteoporose	30
1.8 Modelo Experimental de Ratas	34
2. OBJETIVO	37
3. MATERIAIS E MÉTODO	38
3.1 Animais	38
3.2 Protocolo de Ovariectomia	39
3.3 Grupos Experimentais	40
3.4 Ensaios Mecânicos	41
3.5 Cálculo da Tensão Máxima Aplicada	43
3.6 Propriedades Geométricas	46
3.7 Análise Estatística	49
4. RESULTADOS	50
4.1 Peso Corporal	50
4.2 Peso dos Fêmures.....	52
4.3 Comprimento dos Fêmures.....	53
4.4 Área da Secção Transversal.....	54
4.5 Carga Máxima	55
4.6 Deflexão Máxima	59
4.7 Rigidez.....	60
4.8 Tensão Máxima	61

5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos, a osteoporose tem surgido como grande problema de saúde pública sendo um dos maiores problemas que as mulheres e pessoas idosas de ambos os sexos vêm enfrentando. Segundo RIGGS & MELTON III (1995) o evento mórbido na osteoporose é a fratura. No entanto, a definição de osteoporose não exige a presença de fraturas, mas somente uma diminuição na massa óssea associada com um inaceitável alto risco de fratura. O risco de sofrer tal fratura durante toda a vida é de cerca de 40% para as mulheres e 13% para os homens (WHO, 2003). As fraturas mais comuns atribuídas à osteoporose são as fraturas de quadril e vértebras. A maior taxa de mortalidade ligada a fraturas osteoporóticas é devido a fraturas de quadril (RIGGS & MELTON III, 1995).

Devido às incidências das fraturas causadas pela osteoporose, os custos dessas para a sociedade e o impacto sobre os pacientes têm sido grosseiramente estimados. Atualmente, nos Estados Unidos, o custo direto total de fraturas, somente de quadril, devido à osteoporose é de 10 bilhões de dólares por ano, sem incluir os custos do longo tempo de tratamento domiciliar. Com a previsão de uma vida mais duradoura para as pessoas idosas, o número de fraturas de quadril pode aumentar de 1,7 milhões em 1990 para 6,3 milhões em 2050. Estima-se que 71% destas fraturas ocorrerão em países em desenvolvimento. Essa expectativa só será modificada se os pacientes com maior risco de desenvolver a doença forem precocemente identificados e tratados (WHO STUDY GROUP, 2003).

1.1 O Pico de Massa Óssea

A massa óssea, principal determinante do risco de fraturas em qualquer época da vida, é o resultado do equilíbrio entre a quantidade máxima de tecido ósseo alcançada durante a vida (pico de massa óssea) e a perda óssea associada a eventos fisiológicos ou patológicos. Assim, o pico de massa óssea assume fundamental importância na determinação do risco de fraturas, sendo vinculado e influenciado por diversos fatores ambientais e genéticos (SZEJNFELD, 2000).

Fonte: <http://www.medscape.com>.

Acesso em: 26/set. 2003.

FIGURA 1 – Pico de massa óssea.

A FIGURA 1 ilustra a variação da densidade mineral óssea (BMD) em função da idade. O tecido ósseo é remodelado durante toda a vida, havendo alteração nas taxas de remodelamento em diferentes períodos etários, com especial incremento nos adultos mais idosos. Estudos avaliando a densidade mineral óssea, em mulheres com idade entre 20 e 50 anos, indicaram que o pico de massa óssea adulto é conseguido ao final ou logo após de atingido o crescimento linear do esqueleto, meninas com 14 ou 15 anos já adquiriram cerca de 90% de seu pico de massa óssea, completando seu desenvolvimento ao redor da terceira ou quarta décadas de vida (NETO & FERNANDES, 2001).

O pico de massa óssea do adulto normal, resulta de um equilíbrio morfo-funcional entre a atividade das duas principais células responsáveis pela rigidez do tecido ósseo: o binômio osteoblasto-osteoclasto. Embora 65% a 70% de sua totalidade seja determinada geneticamente, outros fatores podem promover um desequilíbrio na estabilidade desse binômio (NETO & FERNANDES, 2001).

1.2 O REMODELAMENTO E O CRESCIMENTO ÓSSEO

Os ossos moldam o corpo e servem de suporte para os músculos. Um terço do peso do osso é constituído de tecido vivo ligado a uma rede de vasos sanguíneos e nervos, e têm uma arquitetura microscópica bastante complexa. Eles não são permanentes, os minerais que formam sua parte dura (cálcio e fósforo) gradualmente dissolvem-se sendo levados pela corrente sanguínea, enquanto isso novos ossos são formados a partir desses minerais fornecidos pelos vasos sanguíneos, os quais formam pequenos canais em seu interior, esse processo é chamado remodelamento ósseo (MÚSCULOS E OSSOS, 1995).

O remodelamento ósseo (FIGURA 2) constitui-se da formação e reabsorção da matriz orgânica, é feito por células ósseas especializadas. As células envolvidas no remodelamento ósseo são osteócitos, osteoclastos e osteoblastos. Os osteoclastos (FIGURA 3) são células que corroem uma área do osso, iniciando a reabsorção óssea. Os osteoblastos (FIGURA 4) são células atraídas para a cavidade de reabsorção, iniciando a formação óssea (PÁVON & ZANCHETTA). E os osteócitos (FIGURA 4), osteoblastos maduros aprisionados dentro do osso calcificado que posteriormente se mineralizam; essas células possuem numerosos e longos filamentos que mantêm contato através de junções especiais permitindo o fluxo intercelular de íons e outras moléculas que controlam o crescimento e o desenvolvimento ósseo (LIAN & STEIN, 1996).

FIGURA 2 - Esquema ilustrativo do processo de remodelamento no osso trabecular
 ① Osteoclastos; ② Osteoblastos; ③ Osteócitos (PÁVON & ZANCHETTA).

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>.

Acesso: em 26 set. 2003.

FIGURA 3 – Osteoblasto e osteoclasto.

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>.

Acesso: em 26 set. 2003.

FIGURA 4 – Osteoblasto e osteócito.

1.3 TIPOS DE OSSOS

Os ossos são formados por material orgânico e inorgânico e suas propriedades mecânicas estão relacionadas com essa formação. Segundo CURREY (1998) os componentes orgânicos são os responsáveis pela elasticidade e os componentes inorgânicos pela rigidez. Existem dois tipos de tecido ósseo (FIGURA 5): osso trabecular, compõe 20% do esqueleto têm uma estrutura porosa, formam os corpos vertebrais e as extremidades dos ossos longos (MARTIN & DEMPSTER, 1998); osso compacto ou cortical, compõe 80% do esqueleto é duro e denso e forma a parte externa dos ossos e o corpo dos ossos longos, é limitado externamente pelo periósteo, que é importante durante o crescimento e reparo de fraturas, e na sua porção interna, pelo endósteo. Apesar desta predominância, apenas 50% da atividade metabólica ocorrem no osso cortical.

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>.
Acesso: em 26 set. 2003.

FIGURA 5 – Tipos de tecido ósseo e sua organização.

Devido a sua estrutura lamelar, semelhante a um favo de mel, o osso trabecular apresenta uma relação superfície/volume maior que a do osso cortical. O processo de remodelação óssea se faz na superfície dessas

lamelas ósseas, e por essa razão é muito mais rápido no osso trabecular, cerca de quatro a oito vezes maior que a observada no osso cortical. Essa maior área do osso trabecular permite, em função de sua maior atividade metabólica, que o mesmo seja remodelado em 25% do seu total, anualmente, em comparação com apenas 2% a 3% a cada ano do cortical. Essa característica explica a maior incidência de fraturas encontrada em locais do esqueleto onde predomina o osso trabecular (NETO & FERNANDES, 2001).

Os sistemas Harvesianos (ósteons) que compõem o osso cortical, são constituídos por elementos tubulares compostos por lamelas dispostas concentricamente ao redor de um canal central (Harvesiano) contendo vasos sanguíneos (FIGURA 6). A menor atividade metabólica do osso cortical é devido a sua organização espacial em sistemas Harvesianos que fornece uma superfície coberta por células relativamente pequena, em contraste com o osso esponjoso que possui uma grande superfície coberta por células (ERIKSEN et al., 1993).

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>.

Acesso: em 26 set. 2003.

FIGURA 6 – Representação do osso cortical e trabecular.

Diversos hormônios atuam nas células ósseas permitindo que elas assumam suas respectivas funções dentro do tecido, com relevância em determinadas fases do crescimento. Até os 5 anos de vida, é importante a atuação de hormônios tireoidianos. A partir dessa idade e nos próximos 8 anos, ganham relevância os hormônios esteróides andrógenos adrenais. Quando a puberdade se instala, assumem papel decisivo os hormônios testosterona, no homem, e os esteróides ovarianos, na mulher. Há ainda atuação importante do hormônio de crescimento, que influencia a deposição e formação de matriz óssea pela intermediação de fatores de crescimento locais (DEMPSTER & LINDSAY, 1993) e (DIO et al., 1996).

O osso cresce durante as duas primeiras décadas da vida. A seguir, há uma fase de consolidação, durante a qual a massa óssea alcança seu pico, o que é atingido ao redor dos 35 anos de idade para o osso cortical e um pouco antes para o osso trabecular. A partir daí, há um intercâmbio contínuo do osso, o qual possibilita a reparação de qualquer micro lesão que possa ocorrer e para ajuste da sua resistência em conformidade com os histereses mecânicos aos quais ele está submetido (WOOLF & DIXON, 1988).

A partir dos 50 anos para as mulheres na pós-menopausa (FIGURA 7) e 70 anos para os homens, aproximadamente, tem-se uma diminuição de osso trabecular devido à alta invasividade dos osteoclastos, cuja atuação deixa de ser inibida devido à ausência de hormônios esteróides. Ocorre perda de tecido ósseo, pois os osteoblastos não são capazes de repor a massa perdida, assim a velocidade de remodelamento aumenta e a reabsorção excede a formação. As trabéculas tendem a diminuir de espessura, com aumento dos espaços entre elas, causando osteopenia (massa óssea reduzida) podendo levar à osteoporose (SMITH, 1993) e (MILLER et al., 1995).

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>.

Acesso: em 26 set. 2003.

FIGURA 7 – Ilustração do processo de remodelamento após a menopausa.

1.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO

As propriedades mecânicas definem o comportamento de um material quando sujeito a esforços de natureza e correspondem às propriedades que, em certo material, determinam sua capacidade de transmitir e resistir aos esforços aplicados, sem romper ou sem que se produzam deformações incontrolláveis (CHIAVERINI, 1979). O comportamento mecânico do osso pode ser estudado sob dois aspectos: realização de ensaios mecânicos em corpos de prova do tecido ósseo, com dimensões e geometria definidas de acordo com o ensaio a ser realizado e através de seu comportamento mecânico como uma unidade anatômica inteira (osso inteiro), determinando as contribuições e suas propriedades estruturais.

Os componentes fibrosos do osso consistem em 3 tipos: colágeno, se apresenta em feixes e resistem às forças de tração; pequenas fibras de elastina, são elásticas ou resilientes, podem ser tracionadas que ainda recuperam facilmente a forma original quando a força de tração é retirada; e

fibras reticulares, se localizam principalmente na medula óssea e adicionam volume ao órgão (GOULD, 1993).

O osso é matéria viva, e embora metabolicamente dispendioso de produzir, pode ser modelado e remodelado (CURREY, 1998).

Quando um material apresenta propriedades mecânicas que diferem de acordo com a taxa de carregamento diz-se ser um material viscoelástico. A viscoelasticidade é uma propriedade importante do osso e acontece porque o material escoar internamente de acordo com a carga aplicada. Um aumento na taxa de carregamento (ou deformação), aumenta o módulo de elasticidade e a resistência máxima do osso cortical, enquanto há decréscimo da deformação máxima (EINHORN, 1996). A FIGURA 8 ilustra as diferentes configurações da curva tensão x deformação dependentes da velocidade de carregamento.

FIGURA 8 – Diferentes configurações da curva tensão x deformação dependentes da velocidade de carregamento (EINHORN, 1996).

Por serem responsáveis juntamente com os músculos pela movimentação e pela sustentação de órgãos vitais, os ossos estão constantemente sujeitos a tensões de tração, compressão, flexão, torção e, na maioria das vezes, devem suportar uma combinação dessas tensões. Portanto, o conhecimento de suas propriedades mecânicas faz-se necessário.

1.5 ENSAIOS MECÂNICOS

A determinação das propriedades mecânicas de um material pode ser realizada por meio de vários tipos de ensaios que podem ser destrutivos, quando promovem a ruptura ou inutilização do material, são os ensaios de tração, impacto, flexão, torção, compressão, fadiga entre outros; e não destrutivos, quando se utiliza raios-X e ultra-som (SOUZA, 1977).

Os ensaios mecânicos também podem ser classificados de acordo com a velocidade de aplicação da carga: estáticos, com baixa velocidade de aplicação da carga como os ensaios de tração, compressão, torção, cisalhamento e flexão; e dinâmicos, quando as cargas são aplicadas com alta velocidade, dentre eles estão os ensaios de fadiga e impacto. Os ensaios mecânicos de tração, compressão e cisalhamento (FIGURA 9) envolvem a aplicação de forças conhecidas e medida da deformação produzida (HOLANDA, 1999).

FIGURA 9 – Desenho esquemático ilustrando os três tipos básicos de carregamento: tração, compressão e cisalhamento (HOLANDA, 1999).

1.5.1. Ensaio de Flexão

Se forças atuam sobre um material de forma que elas tendem a induzir tensões de compressão no lado onde está sendo aplicada a carga e tensões de tração no lado oposto, diz-se que o material está sob flexão.

SOUZA (1982) reporta que o ensaio de flexão de três pontos trata-se de um ensaio muito aplicado em materiais frágeis ou de elevada dureza para medir sua resistência e ductilidade. Consiste em apoiar o corpo de prova sobre dois apoios distanciados entre si de uma distância (L), com a carga de flexão aplicada no centro (FIGURA 10).

FIGURA 10 - Ensaio de flexão de três pontos.

Durante o ensaio ocorrem esforços normais e tangenciais na secção transversal da amostra, gerando um estado de tensão em seu interior. Se esta curva for gerada por ensaio de ossos inteiros, e não for possível a obtenção das propriedades geométricas, esta inclinação fornecerá a rigidez flexural do osso. No entanto, existe uma linha neutra que não sofre tensão normal ($\sigma = 0$). Esta concentra-se no centro de gravidade, ou seja, está passando pelo centro de gravidade da secção transversal, constituindo um eixo que não sofre deslocamento durante a flexão.

As fibras superiores à linha neutra são comprimidas e as fibras inferiores são tracionadas, considerando que a tensão gerada em qualquer fibra é proporcional à sua distância da linha neutra. Para cada aumento da carga aplicada se obtém a deformação gerada, o que possibilita a construção do gráfico carga x deflexão (FIGURA 11).

A porção linear da curva carga x deflexão é conhecida como região elástica, isto é, o material se deforma somente enquanto a carga está sendo aplicada, retornando ao seu tamanho e dimensões originais quando a carga for removida. Já a porção não-linear da curva é classificada como região plástica. A tensão neste ponto é conhecida como limite elástico. O ponto na curva onde isto ocorre é conhecido como ponto de escoamento, o carregamento adicional além do ponto de escoamento causa deformação permanente no material (EINHORN, 1996).

FIGURA 11 – Gráfico carga x deflexão, a partir do qual são obtidas as principais propriedades mecânicas do ensaio de flexão.

A partir deste gráfico, podem ser obtidas as seguintes propriedades mecânicas: rigidez, limite de proporcionalidade, limite máximo, resiliência e tenacidade (HOLANDA, 1999).

✓ Rigidez Flexural

Corresponde a razão entre a carga aplicada e a deformação obtida na região linear da curva. A rigidez é obtida pelo cálculo da inclinação da curva carga x deflexão na região linear e é dada pela equação:

$$R = \frac{AB}{OB} = \frac{\text{Carga Proporcional}}{\text{Deflexão Proporcional}}$$

✓ Limite de Proporcionalidade

O limite de proporcionalidade é o ponto de término da relação linear entre a carga e a deflexão no gráfico carga x deflexão. Após esse limite, o material sofre um pequeno escoamento, dando início à região plástica, onde não há mais relação linear entre carga e deflexão.

✓ Limite Máximo

O limite máximo é utilizado como critério de avaliação da resistência, e é o maior valor da carga aplicada com a deflexão correspondente observada em cada ensaio (ponto máximo).

✓ Resiliência

É a capacidade do material em absorver energia de forma elástica. Pode ser medida considerando-se o valor da área do triângulo OAB sob a curva carga x deflexão.

✓ Tenacidade

É a capacidade do material em absorver energia até a sua ruptura. Pode ser medida considerando-se o valor total da área abaixo da curva carga x deflexão.

1.6 INFLUÊNCIA DA IDADE NO COMPORTAMENTO MECÂNICO DO OSSO

Como o aumento da idade é associado a mudanças significativas na morfologia e composição óssea (CARTER & SPENGLER, 1978), conseqüentemente há alterações nas propriedades mecânicas. Consideráveis diferenças na composição química dos ossos atribuída à idade e também à região do osso a ser examinado foram encontradas por CAMPO & TOURTELLOTTE (1967).

ZIOUPOS et al. (1999) atribuíram as diferenças de algumas propriedades mecânicas em indivíduos de idades diferentes à mudança na concentração das fibras de colágeno.

CARTER & SPENGLER (1978) encontraram um decréscimo, com a idade, na porcentagem de área ocupada por osso lamelar e, também, uma correlação positiva entre o número de ósteons fragmentados e a idade. Estes achados podem estar diretamente relacionados com o remodelamento interno do osso que ocorre progressivamente ao longo da vida. Estudos realizados por BATTRAU et al., (1996) sobre a análise da área da secção transversal e do momento de inércia de fêmures de ratos, concluíram que os fêmures direito e esquerdo são geometricamente simétricos.

HOYER & LIPPERT (1982), em estudo de fêmur, tíbia e úmero durante o período de vida de animais de ambos os sexos da raça *Wistar*, observaram que o peso corporal dos machos foi significativamente mais alto que o das fêmeas. Até 35 dias de nascidos, o peso corporal é o mesmo para ambos, a partir desse ponto, os machos crescem fundamentalmente mais rápido até o oitavo mês. Já as fêmeas, crescem somente até o quinto mês. A partir daí, há um decréscimo no peso dos machos, mas não das fêmeas (FIGURA 12).

FIGURA 12 – Curva de peso corporal de animais machos e fêmeas da raça *Wistar* em função da idade (HOYER & LIPPERT, 1982).

Os mesmos autores observaram, também, um aumento na carga aplicada, sobre os fêmures, durante a mesma fase em que os animais ganharam peso (FIGURA 13) e apresentaram o aumento no comprimento dos fêmures (FIGURA 14), indicando que a carga aplicada sofre influência da geometria da amostra ensaiada.

FIGURA 13 – Curva da carga aplicada em fêmures de animais machos e fêmeas da raça *Wistar* em função da idade (HOYER & LIPPERT, 1982).

FIGURA 14 – Curva do comprimento dos fêmures de animais machos e fêmeas da raça *Wistar* em função da idade (HOYER & LIPPERT, 1982).

Os autores também afirmam que, em relação aos fêmures, a deflexão é quase constante para ambos os sexos mesmo com o aumento da idade (FIGURA 15). Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparou-se as propriedades mecânicas dos ossos direito e esquerdo.

FIGURA 15 – Curva da deflexão da carga aplicada em fêmures de animais machos e fêmeas da raça *Wistar* em função da idade (HOYER & LIPPERT, 1982).

1.7 OSTEOPOROSE

A osteoporose tem despertado um enorme interesse em todo o mundo científico devido a sua crescente incidência nas últimas décadas, em consonância com o aumento significativo da longevidade humana que se observou no último século. Minimizar suas conseqüências impõe inúmeros

desafios a este novo mundo do terceiro milênio, entre estes, os aspectos educativos se sobrepõem (NETO & FERNANDES, 2001).

Segundo JUNQUEIRA & CARNEIRO (1999) o bom funcionamento do organismo depende da taxa de concentração constante de cálcio no sangue, sua carência alimentar causa a descalcificação dos ossos facilitando, assim, as fraturas. As alterações na taxa de formação e reabsorção do remodelamento influenciam a massa óssea total, sua forma e distribuição.

Em verdade, quando se considera a principal consequência das alterações teciduais na osteoporose, as fraturas, devem ser levadas em consideração fatores determinantes endógenos ou próprios do indivíduo (idade, sexo, etnia, fatores de riscos individuais) e fatores exógenos, mais diretamente ligados às condições que caracterizam o trauma sofrido (fatores de riscos para fraturas, intensidade e tipo de trauma, tempo que o indivíduo fica caído no solo aguardando por socorro) (NETO & FERNANDES, 2001).

Segundo JOHNELL (1996), a osteoporose está principalmente relacionada com a deficiência do hormônio ovariano nas mulheres pós-menopausadas, afetando um terço delas. Acredita-se que dois terços do osso não-remodelado em mulheres idosas está relacionado à menopausa e um terço à idade (RIGGS et al., 1981). A FIGURA 16 mostra outros diversos fatores como hábitos de vida, dieta alimentar, fatores genéticos, atividade física e medicamentos ingeridos que também interferem no aparecimento da osteoporose (NETO & FERNANDES, 2001).

Segundo KRANE et al. (1998), as doenças osteometabólicas incluem desordens generalizadas do esqueleto, como por exemplo: osteopetrose e osteoporose.

A obesidade, fator ligado ao patrimônio genético, é também um efeito protetor a fratura; sua ação sobre a massa óssea, como fator de energia mecânica aplicada sobre o esqueleto, é capaz de estimular a remodelação óssea. Todas essas variáveis interferentes na perda da resistência óssea não têm como serem avaliadas globalmente pelas atuais técnicas de quantificação de massa óssea. Esta limitação dificulta sobremaneira a realização de estudos epidemiológicos que permitam a melhor compreensão dos mecanismos de instalação da osteoporose (NETO & FERNANDES, 2001).

FIGURA 16 - Esquema ilustrativo dos principais fatores que interferem no aparecimento da osteoporose (NETO & FERNANDES, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a osteoporose é a mais freqüente das doenças osteometabólicas, caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, conduzindo a um aumento da fragilidade do osso e a um conseqüente aumento do risco de fratura (WHO STUDY GROUP, 1994) (FIGURA 17).

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>.
Acesso: em 26 set. 2003.

FIGURA 17 – Ilustração de (A) osso sadio e (B) osso osteoporótico;

Pesquisadores observaram que o risco de fratura se relaciona com a medida de densidade mineral óssea, desde então, essa medida tem sido usada para prever o surgimento de fraturas (TABELA 1) através da densitometria de dupla emissão (DXA), metodologia que mais tem se destacado para a aplicação clínica, comumente conhecida como o exame de densitometria óssea e considerada pela OMS como método padrão para o diagnóstico da osteoporose (WHO STUDY GROUP, 1994).

TABELA 1 - Definição do estado ósseo de acordo com o valor da densidade mineral óssea (segundo a OMS).

ESTADO ÓSSEO	DENSIDADE MINERAL ÓSSEA
Normal	até - 1 DP*
Osteopenia	-1,1 até - 2,5 DP*
Osteoporose	menor que - 2,5 DP*
Osteoporose estabelecida	menor que - 2,5 DP* com uma fratura por baixo impacto

*DP - desvio-padrão abaixo da média de mulheres jovens normais (PINHEIRO & SZEJNFELD, 2001).

Além da densitometria óssea, vários outros métodos são empregados no estudo quantitativo do esqueleto em pacientes com osteoporose. Como a microarquitetura óssea representa um importante fator de risco para fragilidade óssea, ela pode ser avaliada, parcialmente, por meio das medidas da ultrassonometria óssea e, indiretamente, pelos marcadores bioquímicos da remodelação óssea. Aspectos geométricos do osso também estão relacionados à fratura, como o comprimento do eixo do quadril e a fratura do fêmur. Além disso, o risco da fratura é influenciado por fatores extra-esqueléticos como os relacionados às quedas e à capacidade para adaptar-se a elas. (PINHEIRO & SZEJNFELD, 2001).

Na osteoporose, as propriedades mecânicas dos ossos podem ser afetadas e o osso se rompe com cargas menores (EINHORN, 1992). Em diferentes modelos experimentais de perda óssea foram observadas alterações

da resistência mecânica, com diminuição da carga de ruptura suportada pelo osso (PENG et al., 1994).

OXLUND et al. (2003) analisando a metáfise distal do fêmur de ratas adultas por meio do teste de compressão, obtiveram, após 3 meses de cirurgia de ovariectomia, diminuição de 23% na carga máxima do grupo de ratas ovariectomizadas comparada com o grupo de ratas submetidas à simulação do cirurgia.

1.8 MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPENIA EM RATAS

Os roedores estão entre os modelos animais mais utilizados na pesquisa de osteoporose, sendo o rato, certamente, o mais utilizado. Entretanto, outros animais como primatas, cães, aves e coelhos também têm sido amplamente utilizados. Além destes, o camundongo aponta como uma perspectiva promissora neste cenário da pesquisa. O rato tem sido usado há décadas na pesquisa experimental da osteoporose e importantes contribuições têm sido alcançadas com seu uso como modelo desde o final da década de 1950, quando estudos com este animal demonstraram a habilidade do osteoclasto em digerir tecido ósseo (SZEJNFELD, 2000).

Com o objetivo de estudar os mecanismos reguladores do metabolismo do cálcio, em processos patológicos como a osteoporose, o rato é comumente utilizado, pois constitui um modelo de estudo para verificar a incidência de perda de massa óssea (HODGKINSON, 1979) e (MILLER et al., 1995).

Segundo FROST & JEE (1992), os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda da massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, bem como na osteoporose, são os mesmos em humanos e além do custo com experimentos com ratos ser menor que 10% das despesas dos experimentos realizados com cães ou primatas. Em relação ao reparo ósseo, o rato também provê um bom modelo para análise de agentes na regeneração desta estrutura corporal. A utilização de modelos animais experimentais é importante para estudar a eficácia e segurança de novas terapias e analisar a atuação de determinada substância no desenvolvimento

de novos medicamentos, o que não pode ser obtido através de pacientes que participam de experimentos clínicos.

Alguns experimentos demonstraram que o osso do rato assim como o do homem, não cresce continuamente durante a sua vida (KALU, 1991), (YU et al., 1982) e (BERG & HARMISON, 1957). Em ratas, ocorre um rápido crescimento até 6 meses de idade. Observa-se um aumento rápido do comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio no fêmur de 1 a 3 meses de idade; depois deste período, a razão de crescimento se torna mais gradual (KALU, 1991). De 6 a 12 meses o crescimento é insignificante e cessa aos 18 meses.

O modelo de rata idosa (12 meses de idade) não possui mais crescimento ósseo devido ao fato de já ter estabelecido a maturidade óssea. Esse modelo possui uma característica de perda óssea semelhantes às que ocorrem na pós-menopausa humana. No entanto, ratas idosas são caras, sua disponibilidade é limitada e longo período decorre antes que se manifestem os efeitos da ovariectomia sobre seus ossos. Em contraste, ratas mais jovens (aproximadamente 3 meses de idade) não são muito caras, são facilmente disponíveis e os efeitos da ovariectomia sobre seus esqueletos se manifestam em um mês ou menos. As características da perda óssea são, geralmente, semelhantes àqueles modelos de ratas idosas (KALU, 1991).

Em relação às diferentes linhagens de animais, existem estudos indicando ratos orquiectomizados da raça *Wistar* (DEBELJUK et al., 1970), (HODGKINSON, 1979) e (DANIELSEN et al., 1992) e da raça *Sprague-Dawley* (HOCK et al., 1998), (GUNNESS & ORWOLL, 1995) e (LI et al., 1995) como modelos de osteopenia experimental.

A osteopenia (ou redução da massa óssea) caracteriza o esqueleto com menos tecido ósseo comparado com o normal e, nesta condição, atividades normais não causam fraturas espontâneas ou dores ósseas, só ocorrendo após queda ou impactos maiores (FROST, 1997). A osteopenia pode estar associada com a idade, desuso mecânico e nas mulheres com a carência de estrógeno. Nas ratas ovariectomizadas, a prevenção de osteopenia com estrógeno também parece ser semelhante ao da mulher. A osteoporose é a doença que combina a osteopenia evidências clínicas do excesso de

fragilidade do osso, acarretando fraturas espontâneas ou dores ósseas durante atividades físicas normais (FROST & JEE, 1992).

O rato, como a maioria dos modelos experimentais em osteoporose, não exhibe fraturas associadas a trauma obtido através da aplicação de cargas de baixa magnitude. Entretanto, essa desvantagem do modelo pode ser contornada com a utilização de modernas técnicas para avaliar a resistência biomecânica do tecido ósseo. Sistemas para a avaliação da resistência à carga mecânica encontram-se validados para o corpo de prova vertebral e fêmur do rato. Isto torna a existência de fraturas prescindível neste modelo (SZEJNFELD, 2000). Segundo BATTRA et al. (1996), os pares de fêmur de ratas apresentam geometria e comportamento mecânico semelhantes quando comparados os lados direito e esquerdo.

Os estudos que induzem deficiência do hormônio ovariano em ratas observam o não aparecimento de fraturas (KALU, 1991) e, ainda, segundo BILEZIKIAN et al. (1996), o fato de animais com quatro patas não caírem sobre seus quadris - não causando assim, microtrincas - colaboram com a instalação de um quadro clínico de osteopenia em ratas castradas.

O mecanismo aceito para perda óssea por deficiência de hormônio estrógeno no esqueleto de ratas se baseia num desequilíbrio com reabsorção excedendo a formação óssea. Com a ovariectomia há uma perda maior no osso trabecular (KALU, 1991), ocorrendo uma diminuição pronunciada da resistência óssea no colo femoral devido à diminuição rápida de osso trabecular existente nesta região (PENG et al., 1994). Já no osso cortical, as perdas são mínimas porque a grande reabsorção na região endosteal é compensada pelo crescimento da área periosteal (BILEZIKIAN et al., 1996) (FIGURA 18).

FIGURA 18 - Reabsorção na região endosteal compensada pelo crescimento periosteal (MARCUS et al., 1996).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é analisar um modelo do processo de instalação de osteopenia em ossos corticais de ratas ovariectomizadas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

As 33 ratas da raça *Wistar*, virgens, foram fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo e foram mantidas no Biotério da Bioengenharia na Escola de Engenharia de São Carlos – USP.

Foi utilizado um modelo de osteopenia em ratas ovariectomizadas com massa corpórea de aproximadamente 250 gramas.

No período selecionado, os animais foram pesados e eutanasiados com excesso de inalação de anestésico e, em seguida, os fêmures foram retirados, limpos das partes moles e pesados individualmente em balança eletrônica marca METTLER®, modelo AT261DeltaRange com precisão de 4 casas decimais utilizada no Laboratório de Saneamento no Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC – USP.

Realizou-se também a medida dos diâmetros (maior e menor) da diáfise e comprimento de todas as amostras com paquímetro.

Em sequência, os fêmures foram envoltos em gaze embebida em solução fisiológica e armazenados em recipientes que continham as identificações (Grupo e direito/esquerdo) para serem conservados a -20°C .

3.2 PROTOCOLO DE OVARECTOMIA BILATERAL

As ratas foram submetidas a anestésico inalante (éter).

Tricotomia com lâminas:

- Incisão realizada na pele (FIGURA 19);
- Afastamento do corpo muscular;
- Através do uso de pinça odontológica, foram pinçadas as alças ovarianas e posteriormente expostos os ovários;
- Assim, efetuada a exteriorização dos ovários, os mesmos foram amarrados com fios de algodão (FIGURA 20);
- Após, foram feitas as excisões (FIGURA 21);
- Procurou-se recolocar as alças em rotina pouco traumática;
- Com linha absorvível, ocorreu sutura interna – quando o plano de campo cirúrgico atingiu mais de 2 cm, a fim de minimizar hérnia (freqüentes no piloto);
- Os procedimentos finais implicaram a sutura da pele, com posterior desinfecção do local suturado (FIGURA 22).

O protocolo foi realizado pelo responsável pelo Centro Cirúrgico da Bioengenharia da Universidade de São Paulo, campus São Carlos. Processo descrito por completo em ZARROW et al. (1964).

FIGURA 19 – Incisão transversal.

FIGURA 20 – Evisceração do corpo ovariano.

FIGURA 21 – Excisão dos ovários.

FIGURA 22 – Sutura e desinfecção.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A ovariectomia foi realizada em 33 animais, no entanto, durante a cirurgia, um animal morreu, provavelmente por excesso de inalação de anestésico. Já na fase de recuperação, foram perdidos mais três animais, em um caso houve canibalismo e os outros dois, a causa da morte é desconhecida.

Os 29 animais restantes foram divididos em 6 grupos com 5 animais cada (exceto Grupo 6 – 4 animais). Cada um dos 5 animais de cada grupo foi marcado para a diferenciação dos mesmos em A (pata anterior direita), B (pata anterior esquerda), C (pata posterior direita), D (pata posterior direita) e E (sem marca), para tal procedimento utilizou-se uma solução aquosa saturada de ácido pícrico que produziu uma mancha amarela no local aplicado. As ratas foram colocadas em gaiolas plásticas onde permaneceram em temperatura ambiente, com livre acesso à alimentação padrão e água *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados em diferentes períodos após a ovariectomia (OVX) (TABLELA 2):

TABLELA 2 – Divisão dos grupos, dias da eutanásia após a cirurgia e número de animais em cada grupo.

GRUPO	EUTANÁSIA (Dias após OVX)	NÚMERO DE ANIMAIS
1	30	5
2	45	5
3	60	5
4	75	5
5	90	5
6	105	4

3.4 ENSAIOS MECÂNICOS

Os ensaios mecânicos de flexão de três pontos foram realizados na Máquina Universal de Ensaio Mecânicos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Para isto, os fêmures foram retirados do “freezer” 12 horas antes do ensaio e colocados em refrigerador comum. No dia do ensaio foram retirados do refrigerador 2 horas antes para entrar em equilíbrio com o meio ambiente. As amostras foram levadas em caixa térmica para que a mesma temperatura fosse mantida durante a viagem. Segundo HOYER & LIPPERT (1982), não há diferença significativa entre as propriedades biomecânicas de ossos ensaiados a fresco e congelados.

Foi utilizada uma célula de carga KRATOS® com capacidade de 50Kg (FIGURA 23) e um relógio comparador MITUTOYO® (para medida da deflexão). Utilizou-se, também, (A) uma base de apoio com distância entre apoios (L) de 20mm e (B) um acessório para aplicação da carga (F) (FIGURA 24).

FIGURA 23 - Relógio comparador MITUTOYO® (para medida da deflexão) e célula de carga KRATOS® com capacidade de 50Kg.

FIGURA 24 - (A) Base de apoio com $L=20$ mm e (B) acessório para aplicação da carga (F).

Durante os ensaios foi utilizada uma velocidade de aplicação de carga de 0,20 mm/ minuto. Os fêmures foram apoiados nas regiões metafisárias e a carga aplicada na região central de cada osso.

A aplicação da carga (F) foi na vertical, de cima para baixo, sempre com as amostras em posição antero-posterior, de maneira semelhante à utilizada por PESSAN (1996) na realização de seus ensaios. Este autor verificou que o fêmur do rato apresenta praticamente a mesma resistência aos esforços de flexão aplicados na face côncava ou convexa.

Os ensaios tiveram uma pré-carga de 300g e tempo de acomodação de 1 minuto que serviram para minimizar as possíveis folgas existentes no sistema máquina-acessório-osso.

Todas as amostras, direitas e esquerdas, foram ensaiadas até a carga máxima, como nem todas romperam (FIGURA 25) (algumas apresentaram uma diminuição da carga) realizaram-se mais 10 medidas após o pico para a obtenção do gráfico carga x deflexão e, assim calculadas as seguintes propriedades mecânicas: limite de proporcionalidade e respectiva deflexão, limite máximo e respectiva deflexão e rigidez. Para o cálculo de tais propriedades mecânicas foi utilizado o programa Origin, Versão 4.1. A FIGURA 26 mostra um exemplo de uma curva carga aplicada x deflexão obtida para um fêmur ensaiado 45 dias após a ovariectomia.

*Local onde foi aplicada a carga durante o ensaio de flexão.
FIGURA 25 – Amostra de fêmures fraturados e não fraturados após o ensaio de flexão.

FIGURA 26 – Exemplo de uma curva carga aplicada x deflexão obtida no programa Origin 4.1. para um fêmur ensaiado 45 dias após a ovariectomia.

As amostras direitas foram utilizadas para os cálculos das propriedades geométricas: comprimento e peso dos fêmures, área da secção transversal (momento de inércia e posição da linha neutra). Segundo BATTEAW et al. (1996), os pares de fêmures de ratas apresentam geometria e comportamento mecânico semelhantes quando comparados o lado esquerdo e direito.

3.5 CÁLCULO DA TENSÃO MÁXIMA APLICADA

Mudanças no comportamento mecânico dos ossos são influenciadas não somente pelo material, mas também por sua forma e tamanho. Segundo FUNK et al. (2000), a propriedade que leva em consideração estas duas

propriedades é a tensão máxima aplicada. Neste estudo, o cálculo da tensão máxima aplicada foi realizado somente nas amostras direitas.

No ensaio de flexão de três pontos a tensão (σ) é dada por:

$$\sigma = \frac{M \cdot c}{I}$$

Onde: M é o Momento Fletor;

c é a distância da Linha Neutra;

I é o Momento de Inércia.

O momento fletor (M) no local de aplicação de carga é dado por:

$$M = F \cdot \frac{L}{2}$$

Onde: F é a carga aplicada;

L é a distância entre os dois apoios.

O valor da distância da linha neutra (c) muda à medida que se altera o posicionamento da amostra. A FIGURA 27 ilustra uma amostra da área da secção transversal da diáfise do fêmur em três diferentes posições obtidas através do programa AutoCAD R14®, conseqüentemente observa-se três diferentes valores de distância para a linha neutra.

FIGURA 27 – Amostra da área da secção transversal em três diferentes posições e três diferentes valores de distância para a linha neutra obtidas através do programa AutoCAD R14®.

Conforme observado na FIGURA 28, as amostras foram posicionadas em uma placa metálica, escaneadas e as imagens inseridas no programa AutoCAD R14[®] utilizado para o cálculo da área transversal, momento de inércia e linha neutra. Considerou-se a direção em que a carga foi aplicada sobre a amostra para o cálculo da linha neutra (FIGURA 29). A FIGURA 30 ilustra um exemplo de uma curva tensão x deflexão obtida no programa Origin 4.1. para um fêmur ensaiado 60 dias após a ovariectomia.

FIGURA 28 – Ilustração do posicionamento das amostras a serem escaneadas.

FIGURA 29 – Amostra com posicionamento padronizado no programa AutoCAD R14[®], para cálculo área transversal, momento de inércia e linha neutra.

FIGURA 30 – Exemplo de uma curva tensão x deflexão obtida no programa Origin 4.1. para um fêmur ensaiado 60 dias após a ovariectomia.

3.6 PROPRIEDADES GEOMÉTRICAS

Somente os fêmures direitos foram utilizados para a análise das propriedades geométricas.

Para análise da área as amostras foram cortadas na região do terço medial, local onde aplicou-se a carga para o ensaio de flexão de três pontos, como o uso de uma caneta odontológica de alta rotação e de forma que a área a ser analisada formasse um plano paralelo ao vidro do *scanner* HP Scanjet3c[®], onde foram colocadas para que a área desejada fosse escaneada.

As amostras que já haviam sido fraturadas durante o ensaio de flexão de três pontos foram simplesmente “moldadas” de forma que a área a ser analisada ficasse “plana” e as amostras não fraturadas foram cerradas através do mesmo procedimento.

Utilizou-se a metade proximal de cada amostra, e estas foram fixadas com o auxílio de massa de modelar colorida em uma placa de aço inoxidável com 5 furos de 5mm cada cedida pelo Departamento de Engenharia de Materiais da EESC – USP. A massa de modelar colorida foi utilizada para diferenciar os cinco animais que formavam cada grupo (animais A, B, C, D e E) e a placa foi utilizada para facilitar a fixação das amostras no vidro do *scanner* (FIGURA 31).

FIGURA 31 - Placa de aço inoxidável com 5 furos de 5 mm cada cedida pelo Departamento de Engenharia de Materiais da EESC – USP.

A FIGURA 32 apresenta todas as imagens das secções transversais dos fêmures escaneadas e divididas nos 6 grupos e as respectivas identificações para cada um dos cinco animais. Em seguida, elas foram transferidas para o programa AutoCAD R14[®], onde obteve-se a área transversal, o momento de inércia e a linha neutra de cada uma das amostras.

FIGURA 32 – Imagens das secções transversais dos fêmures escaneadas e divididas nos 6 grupos e as respectivas identificações para cada um dos cinco animais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada um dos itens obtidos foram analisados utilizando-se o programa GraphPad InStat 3. O teste *t-Student* foi aplicado para checar a variação do peso corporal com $p < 0,05$. Aplicaram-se os testes ANOVA e *Student-Newman-Keuls* com coeficiente de variação também menor que 5% para os demais itens analisados.

4. RESULTADOS

Para os resultados finais, algumas amostras foram descartadas, pois apresentaram dados muito diferentes da maioria, acredita-se que houve um manuseio incorreto das amostras.

4.1 PESO CORPORAL

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento de peso corporal significativo ($p < 0,05$) (FIGURA 33). A taxa de ganho de peso variou de 23,6% a 38,3%.

O teste estatístico utilizado para tal achado foi o *t-student*. A TABELA 3 apresenta valor médio, desvio padrão do peso corporal inicial e final e o respectivo valor de p para cada grupo.

TABELA 3 - Valor médio e desvio padrão do peso corporal inicial e final e respectivo valor de p de cada grupo experimental.

Dias após OVX	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	p
30	256±15	330±25	$1,056 \times 10^{-3}$
45	235±10	325±6	$2,04 \times 10^{-4}$
60	267±6	330±17	$1,09 \times 10^{-2}$
75	245±24	325±44	$7,292 \times 10^{-3}$
90	244±18	322±19	$9,096 \times 10^{-5}$
105	245±19	330±27	$8,6 \times 10^{-5}$

FIGURA 33 - Valor médio do peso corporal inicial e final de cada grupo experimental.

4.2 PESO DOS FÊMURES

Todos os grupos experimentais apresentaram valor médio do peso dos fêmures similares (FIGURA 34). A TABELA 4 apresenta o valor médio e desvio padrão do peso das amostras de cada grupo.

FIGURA 34 - Valor médio do peso dos fêmures de cada grupo experimental.

TABELA 4 - Valor médio e desvio padrão do peso das amostras de cada grupo experimental.

Dias após OVX	Peso (g)
30	0,90±0,07
45	0,94±0,10
60	0,95±0,11
75	0,96±0,07
90	0,94±0,05
105	0,96±0,07

Para a análise estatística utilizou-se a *análise de variância* (ANOVA), e não verificou-se diferença estatisticamente significativa no peso dos fêmures entre os grupos experimentais ($p=0,6106$).

4.3 COMPRIMENTO DOS FÊMURES

A análise estatística feita através da *análise de variância* (ANOVA) indicou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0204$) entre os grupos experimentais; foi utilizado, então, o teste *Student-Newman-Keuls* com $p<0,05$; verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos 30 dias e 60 dias, e 45 dias e 60 dias (FIGURA 35).

*Diferença estatisticamente significativa.

FIGURA 35 - Valor médio do comprimento dos fêmures de cada grupo experimental.

A TABELA 5 apresenta o valor médio e desvio padrão para o comprimento das amostras em cada grupo experimental.

TABELA 5 - Valor médio e desvio padrão do comprimento das amostras de cada grupo experimental.

Dias após OVX	Comprimento (mm)
30	37,28±0,77
45	37,28±1,11
60	38,74±1,37
75	37,97±1,21
90	37,35±0,77
105	37,89±0,77

4.4 ÁREA DA SECÇÃO TRANSVERSAL

Todos os grupos experimentais apresentaram valor médio da área da secção transversal dos fêmures similares (FIGURA 36). A TABELA 6 apresenta o valor médio e desvio padrão da área da secção transversal das amostras de cada grupo.

FIGURA 36 - Valor médio da área da secção transversal dos fêmures de cada grupo experimental.

TABELA 6 - Valor médio e desvio padrão da área da secção transversal das amostras de cada grupo experimental.

Dias após OVX	Área da secção transversal (mm ²)
30	6,3±1,0
45	5,9±0,6
60	5,9±0,8
75	5,5±0,05
90	5,8±0,6
105	5,6±0,6

Para a análise estatística utilizou-se a *análise de variância* (ANOVA), e não verificou-se diferença estatisticamente significativa na área da secção transversal dos fêmures entre os grupos experimentais ($p=0,6388$).

4.5 CARGA MÁXIMA

As FIGURAS 37 - 42 ilustram os gráficos carga x deflexão para cada um dos grupos eutanasiados em diferentes períodos.

FIGURA 37 – Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 30 dias após a OVX.

FIGURA 38 – Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 45 dias após a OVX.

FIGURA 39 – Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 60 dias após a OVX.

FIGURA 40 – Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 75 dias após a OVX.

FIGURA 41 – Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 90 dias após a OVX.

FIGURA 42 – Gráfico carga x deflexão do grupo eutanasiado 105 dias após a OVX.

A TABELA 7 e a FIGURA 43 apresentam o valor médio e desvio padrão da carga máxima aplicada sobre as amostras de cada grupo experimental.

A análise estatística feita através da *análise de variância* (ANOVA) indicou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0238$) entre os grupos experimentais; foi utilizado, então, o teste *Student-Newman-Keuls* com $p<0,05$; verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos 30 dias e 60 dias (FIGURA 43).

*Diferença estatisticamente significativa.

FIGURA 43 - Valor médio da carga máxima aplicada sobre os fêmures de cada grupo experimental.

TABELA 7 - Valor médio e desvio padrão para carga máxima aplicada sobre as amostras em cada grupo.

Dias após OVX	Carga máxima aplicada (N)
30	94±11
45	99±5
60	105±11
75	94±4
90	95±7
105	95±6

4.6 DEFLEXÃO MÁXIMA

Todos os grupos experimentais apresentaram valor médio da deflexão máxima dos fêmures similares (FIGURA 44). A TABELA 8 apresenta o valor médio e desvio padrão da deflexão máxima das amostras de cada grupo.

FIGURA 44 - Valor médio da deflexão máxima dos fêmures de cada grupo experimental.

TABELA 8 - Valor médio e desvio padrão da deflexão máxima das amostras em cada grupo experimental.

Dias após OVX	Deflexão máxima (10 ⁻³ m)
30	0,69±0,03
45	0,67±0,04
60	0,73±0,07
75	0,74±0,11
90	0,71±0,06
105	0,75±0,06

Para a análise estatística utilizou-se a *análise de variância* (ANOVA), e não verificou-se diferença estatisticamente significativa na deflexão máxima dos fêmures entre os grupos experimentais ($p=0,2466$).

4.7 RIGIDEZ

Todos os grupos experimentais apresentaram valor médio da rigidez dos fêmures similares (FIGURA 45). A TABELA 9 apresenta o valor médio e desvio padrão da rigidez das amostras de cada grupo.

FIGURA 45 - Valor médio da rigidez dos fêmures de cada grupo experimental.

TABELA 9 - Valor médio e desvio padrão da rigidez das amostras em cada grupo experimental.

Dias após OVX	Rigidez (10^3 N/m)
30	204±28
45	213±16
60	215±12
75	206±18
90	202±9
105	204±15

Para a análise estatística utilizou-se a *análise de variância* (ANOVA), e não verificou-se diferença estatisticamente significativa na rigidez dos fêmures entre os grupos experimentais ($p=0,6331$).

4.8 TENSÃO MÁXIMA

As FIGURAS 46 - 51 ilustram os gráficos tensão x deflexão para cada um dos grupo eutanasiados em diferentes períodos.

FIGURA 46 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 30 dias após a OVX.

FIGURA 47 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 45 dias após a OVX.

FIGURA 48 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 60 dias após a OVX.

FIGURA 49 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 75 dias após a OVX.

FIGURA 50 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 90 dias após a OVX.

FIGURA 51 – Gráfico tensão x deflexão do grupo eutanasiado 105 dias após a OVX.

Todos os grupos experimentais apresentaram valor médio da rigidez dos fêmures similares (FIGURA 52). A TABELA 10 apresenta o valor médio e desvio padrão da tensão máxima das amostras de cada grupo.

FIGURA 52 - Valor médio da tensão máxima dos fêmures de cada grupo experimental.

TABELA 10 - Valor médio e desvio padrão da tensão máxima das amostras dos fêmures em cada grupo experimental.

Dias após OVX	Tensão máxima (MPa)
30	280±37
45	279±39
60	283±16
75	302±28
90	275±27
105	255±9

Para a análise estatística utilizou-se a *análise de variância* (ANOVA), e não verificou-se diferença estatisticamente significativa na tensão máxima dos fêmures entre os grupos experimentais ($p=0,1984$).

5. DISCUSSÃO

O número de pessoas acima de 65 anos de idade está aumentando nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Em países como o Reino Unido e a Suécia, esta população já supera os 15%. A mais temida doença associada à idade é a osteoporose, e a ela, a fratura de quadril. É uma grave consequência que resulta do somatório dos seguintes componentes: diminuição do conteúdo mineral ósseo e diminuição da microarquitetura óssea, geometria, fatores genéticos e risco de queda. Até o momento, só é possível atuar sobre o conteúdo mineral e o risco de queda, uma vez que ainda não existe terapia capaz de refazer o trabeculado ósseo ou alterar a composição genética do indivíduo (SZEJNFELD, 2000).

O mesmo autor, estudando mudanças relacionadas ao sexo e idade na competência biomecânica da estrutura vertebral, observou que tanto a densidade quanto a resistência óssea diminuíram com a idade em ambos os sexos. Além disso, revelou que o espaço entre as trabéculas horizontais aumentava com a idade, sendo maior em mulheres, o que implica em um maior risco de fraturas.

Segundo SHIMANO (2001), a idade é um parâmetro importante a ser considerado no estudo das propriedades mecânicas dos ossos, pois é inevitável e exerce grande influência no comportamento mecânico do tecido ósseo.

Os ossos possuem diferentes propriedades em diferentes direções, um fenômeno conhecido como anisotropia, enquanto que outros materiais são isotrópicos, isto é, independentemente da direção da carga aplicada, suas propriedades mecânicas serão sempre as mesmas. A resistência e a rigidez do osso são maiores na direção onde normalmente as cargas são aplicadas. Isto é

particularmente verdadeiro para o osso cortical, onde ósteons são orientados na direção longitudinal devido ao tipo de carregamento que é aplicado nesta região (HOLANDA, 1999).

Especial atenção deve ser devotada à alimentação dos animais: restrição dietética é importante para padronizar o ganho de peso nos animais ooforectomizados, bem como para assegurar e acelerar a perda óssea (SZEJNFELD, 2000) devido ao efeito piezelétrico. Animais alimentados com uma dieta rica em cálcio devem ser evitados nas pesquisa, já que o consumo excessivo de cálcio diariamente reduz a “sensibilidade” dos ossos a perda causada pela ovariectomia (KALU, 1991).

KALU (1991) e HOYER & LIPPERT (1982), estudando fêmures de ratas sadias *Wistar*, observaram o aumento de peso dos animais durante a fase de crescimento. Neste estudo, observou-se um aumento da massa corporal significativo dos animais após a ovariectomia durante o período analisado.

HOYER & LIPPERT (1982), KALU (1989) e BILEZIKIAN et al. (1996) descreveram um aumento significativo no comprimento de fêmures durante a fase de crescimento e, em seguida, uma estabilização, o que sugere que os resultados aqui obtidos estão corretos, uma vez que foi encontrada diferença significativa apenas entre os três primeiros grupos experimentais (3 a 4 meses de idade). HOYER & LIPPERT (1982) observaram, também, um aumento na carga aplicada durante a mesma fase em que os animais ganharam peso.

Já a deflexão máxima apresentou-se constante mesmo com o aumento da idade, concordando com os resultados obtidos por HOYER & LIPPERT (1982). Em seus estudos, KALU (1989) relatou os mesmos achados, e incluiu também uma avaliação da densidade e conteúdo de cálcio no fêmur. Ambas aumentaram rapidamente até 3 meses, apresentaram uma fase mais gradual (3 a 6 meses), e após este período, não houve maiores alterações.

O efeito piezoelétrico também representa um grande fator, uma vez que a aplicação de forças mecânicas sobre a matriz osteóide altera sua composição e produz fatores de crescimento responsáveis pela remodelação óssea, que pode interferir na atividade osteoclástica e osteoblástica. Como exemplos, cita-se as mudanças de forma do esqueleto durante a fase de

crescimento devido a aplicação de forças durante a marcha e os astronautas participantes dos projetos GEMINI e APOLO que saíram da órbita gravitacional da Terra e, ao voltarem, apresentaram uma perda de aproximadamente 40% da massa óssea (NETO & FERNANDES, 2001).

Apesar do osso se encontrar em fase de crescimento, há um aumento em sua porosidade. Sabe-se que, com a ovariectomia, a reabsorção óssea excede o remodelamento, com isso há perda de massa óssea; no entanto essa perda é mais observada no osso trabecular, uma vez que são as trabéculas que diminuem de espessura, aumentando assim, o espaço entre elas (SMITH, 1993 ; MILLER et al., 1995). Portanto, o aumento de peso do fêmur esperado na fase de crescimento não é observado.

CUREY (1959) verificou, ainda, que o aumento na quantidade de ósteons aumenta a porosidade do osso, diminuindo a resistência à tração; com isto, locais com poucos ósteons de grande tamanho possuem maior densidade óssea e, conseqüentemente, maior resistência à tração.

Segundo PENG et al, 1994, ocorre uma diminuição pronunciada da resistência óssea em regiões trabeculares porque, nestas áreas, a absorção óssea excede o remodelamento. Já no osso cortical, as perdas são mínimas porque a grande reabsorção na região endosteal é compensada pelo crescimento da área periosteal (BILEZIKIAN, 1996). Por isso não observou-se o afinamento da área da secção transversal analisada.

O ensaio de flexão de três pontos demonstrou ser um bom ensaio estático para o estudo das propriedades mecânicas do osso cortical de fêmures devido à adequação do formato desse tipo de osso ao acessório de apoio, além de ser um ensaio de rápida realização.

Algumas amostras sofreram fratura durante o ensaio de flexão, e a região óssea danificada não adquiriu um plano reto; por isso houve a necessidade do uso da caneta de alta rotação para molda-las e obter, assim, um plano paralelo ao vidro do scanner utilizado.

Algumas propriedades mecânicas, como a tensão máxima e propriedades viscoelástica, dependem não somente da composição do osso,

como da porcentagem de ossos compactos e esponjosos, ligação entre as fibras, porcentagem de osso harvesiano e densidade óssea, mas também da estrutura óssea e da forma geométrica das diferentes áreas do osso (HOLANDA, 1999). Os valores da tensão levam em conta a geometria do fêmur e o momento de inércia da área da secção transversal próxima ao local de fratura.

Sabe-se que a tensão é uma função inversamente proporcional a área da secção transversal, isto é, quanto maior a área, menor a tensão e vice-versa. Fato este que apóia os achados, já que também não foram observadas alterações na área da secção transversal e na tensão máxima obtida durante este trabalho.

No ensaio de flexão, o tamanho e a geometria da área da secção transversal afetam diretamente o resultado. A propriedade que relaciona estes dois parâmetros é chamada Momento de Inércia (maior valor da área da secção transversal caracteriza um osso mais forte e mais rígido) que se relacionado com o valor da linha neutra e influencia diretamente o valor da tensão.

O valor da linha neutra muda à medida que se altera o posicionamento da amostra. Na fase de escaneamento, as amostras foram posicionadas em uma placa metálica de maneira que as cabeças femorais não se encostassem, podendo, caso contrário, não ficarem totalmente paralelas ao plano do vidro do *scanner*. No entanto, quando inseridas no programa AutoCAD R14[®] utilizado para o cálculo da área transversal, momento de inércia e linha neutra, todas as amostras foram padronizadas de maneira que o posicionamento do eixo x do programa formasse um plano paralelo ao plano da base de apoio, ou seja, considerou-se a direção em que a carga foi aplicada sobre a amostra para o cálculo da linha neutra.

Nesta mesma fase, optou-se pelo uso de massa de modelar colorida por duas razões: facilidade de manuseio e modelagem, uma vez que mínimos movimentos alterariam no resultado da área da secção transversal do fêmur a ser obtida; e as cores auxiliaram na diferenciação de cada um dos cinco animais dentro dos seis grupos experimentais.

Um outro fator que também foi de grande ajuda na identificação dos animais foi o uso da solução aquosa saturada de ácido pícrico que produziu uma marca amarela na pata de marcação padronizada dos animais.

6. CONCLUSÃO

- O remodelamento ósseo mostra uma grande influência sobre as propriedades mecânicas e geométricas dos ossos corticais durante a fase de crescimento, mesmo em ratas osteopênicas, pois houve um aumento significativo no comprimento dos fêmures e na carga máxima aplicada durante o primeiro mês de experimento.
- Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a ovariectomia é um fator que, apesar de muito sensível para o osso trabecular, não causa grandes alterações mecânicas e geométricas na região cortical dos fêmures de ratas no período analisado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTRAW, G.A.; MIERA, V.; ANDERSON, P.L.; SZIVEK, J.A. (1996). Bilateral symmetry of biomechanical properties in rat femora (technical note). *Journal of Biomedical Materials Research*, v.32, n.2, p.285-288.

BERG, B.N.; HARMISON, C.R. (1957). Growth, disease, and aging in the rat. *J. Gerontol*, v.12, p.370-377, *apud* KALU, D. N. (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, v.15, p.175-192.

BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. (1996) *Principles of Bone Biology*. 1. ed. San Diego: Academic Press. 1398 p.

CAMPO, R.D.; TOURTELLOTTÉ, C.D. (1967) The composition of bovine cartilage and bone. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.141, n.3, p.614-624.

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

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

CURREY, J.D. (1959) Differences in the tensile strength of bone of different histological types. *J. Anat.*, v.93, p.87-95.

CURREY, J.D. (1998) The Mechanical Adaptations of Bones. In: STEVENSON, J. C.; LINDSAY, R. *Osteoporosis*. Princeton University Press. Chapman & Hall Medical, p.1-28.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; ANDREASSEN, T.T. (1992) Long-Term Effect of orchidectomy on Cortical Bone from Rat Femur: Bone Mass and Mechanical Properties. *Calcified Tissue International*, v.50, p.169-174.

DEBELJUK, L.; FEDRE, V.M; PAULUCCI, O. A. (1970) Effects of Melatonin on Changes Induced by Castration and Testosterone in Sexual Structure of Male Rats. *Endocrinology*, v.87, p.1358-60.

DEMPSTER, D.W.; LINDSAY, R. (1993) Pathogenesis of Osteoporosis. *The Lancet*, v. 341, p. 797-801.

DIO, R.D.; BARBÉRIO, J.C.; PRADAL, M.G.; MENEZES, A.M.S. (1996) *Novos recursos para a investigação de Doenças Ósseas*. São Paulo: Criesp.

ERIKSEN, A. et al (1993) *Bone remodeling and bone struture*. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. *Physiology and pharmacology of bone*. Berlim: Springer-Verlag. Cap.2, p.67-109.

EINHORN, T.A. (1992). Bone strength: the bottom line. *Calcified Tissue International*. v.51, p.333-339.

EINHORN, T.A. *Biomechanics of Bone*, (1996). In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. Cap.3, p.25-37.

FROST, H.M.; JEE, W.S.S. (1992) On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone and Mineral*, v. 18, p. 227-236.

FROST, H.M. (1997) Defining osteopenia and osteoporosis: another view (with insights from a new paradigm). *Bone*, v.20, n.5, p.385-391.

FUNK, J.R.; HALE, J.E.; CARMINES, D.; GOOCH, H.L.; HURWITZ, S.R. (2000) Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *Journal of Orthopaedic Research*, v.18, n.1, p.126-132.

GOULD, J.A. (1993) *Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte*. São Paulo: Manole, p.3-47.

GUNNESS, M.; ORWOLL, E. (1995) Early Induction of Alterations in Cancellous and Cortical Bone Histology After Orchidectomy in Mature Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.10, p.1735-43.

HOCK, J.M.; GERA, I.; FONSECA, J.; RAISZ, L.G. (1998) Human Parathyroid Hormone Increases Bone mass in Ovariectomized and Orchiectomized Rats. *Endocrinology*, v.122, n.6, p.2899-2904.

HODGKINSON, A. (1979) Effects of calcium Deprivation and Orchidectomy on Bone Composition in the rat. *Horm. Metab. Res.*, v.11, p.516-519.

HOLANDA, A.J. (1999) *Efeitos da orientação das fibras de colágeno nas propriedades mecânicas de flexão e impacto dos ossos*. 55p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

HOYER, H.-E.; LIPPERT, H. (1982) Biomechanical changes in long limb bones of HAN-Wistar rats during the postnatal development. *Anat. Embryol.*, v.164, p.101-111.

JOHNELL, O. (1996) Advances in osteoporosis: better identification of risk factors can reduce morbidity and mortality. *J. Int. Med*, v. 239, p. 299-304,. In: DRIUSSO, P. (2000) *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*.. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

JUNQUEIRA. L.C.; CARNEIRO, J. (1999) *Histologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 427 p.

KALU, D.N.; LIU, C.C.; HARDINI, R.R.; HOLLS, B.W. (1989) The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, v.124, n.1, p.7-15.

KALU, D.N. (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, v.15, p.175-192.

KRANE, S.M. et al. (1998) Metabolic Bone Disease: Introduction and Classification. In: STEVENSON, J. C.; LINDSAY, R. *Osteoporosis*. Chapman & Hall Medical.

LI, M.; JEE, W.S.S.; KE, H.Z.; TANG, L.Y.; MA, Y.F.; LIANG, X.G.; SETTERBERG, R.B. (1995) Prostaglandin E2 administration prevents bone loss induced by orchidectomy in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.10, p.66-73.

LIAN, J. B.; STEIN, G. S. (1996) Osteoblast Biology. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press, p.23-59.

MARTIN, T. J.; DEMPSTER, D. W. (1998) Bone structure and Cellular Activity. In: STEVENSON, J. C.; LINDSAY, R. *Osteoporosis*. Chapman & Hall Medical, p.1-28.

MILLER, S.C.; BOWMAN, B.M.; JEE, W.S.S. (1995) Available animal models of osteopenia - small and large. *Bone*, v.17, n.4, p.117-123, oct,.

MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (1996) *Osteoporosis*, San Diego: Academic Press, 1373p.

MÚSCULOS E OSSOS: Os alicerces do corpo (1995). Autor e Produção de Discovery Channel. São Paulo: Vídeos Abril. Videocassete (25 min.): VHS, son.,color. Gravação. Port.

NETO, J. F. M.; FERNANDES, C. E. (2001) Mecanismos de desenvolvimento da osteoporose e suas implicações clínico-terapêuticas em Projeto Osteoporose 2001, Presente e futuro da osteoporose: aspectos clínicos e terapêuticos. *Sociedade Brasileira de Osteoporose (SOBRAO)* Cap. 2., p.1-30.

OXLUND, B.S.; ORTOFT, G.; ANDREASSEN, T.T.; OXLUND, H. (2003). Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone*, v.32, p.69-77.

PAVÓN, S.J.; ZANCHETTA, J.R. (Coord.). *Osteoporosis - Biblioteca Médica Digital (BMD)*, Buenos Aires, Data Visión S.A., [s.d]. CD-ROM

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; ZHANG, H.; JÄMS, T.; VÄÄNÄNEN, H.K. (1994) The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone*, v.15, n.5, p.523-532.

PESSAN, V.J.O. (1996) *Ensaio de flexão em três pontos nas faces anterior e posterior de fêmures de ratas, em duas fases diferentes de crescimento*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PINHEIRO, M.M.; SZENFELD, V.L. (2001) Osteoporose: Quadro clínico, qualidade de vida e diagnóstico. *Revista Sinopse de Reumatologia* (Grupo Editorial Moreira JR.) São Paulo, v.A3, n.4, out.. Disponível em: <http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=1653>. Acesso em: 08 out. 2001.

RIGGS, B.L., WAHNER, H.W.; DUNN, W.L.; MAZESS, R.B.; OFFORD, K.P; MELTON, L.J.III (1981) Differential Changes in Bone Mineral Density of the Appendicular and Axial Skeleton with Aging: Relationship to Spinal Osteoporosis. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v.67, p.328-335.

RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. (1995) The Worldwide Problem of Osteoporosis: Insights Afforded by Epidemiology. *Bone*, v.17, n.5 (supl), p.5055-5115, nov..

SHIMANO, M.M. (2001) *Histerese de fêmur de ratas submetidos a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias*. 82p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SMITH, R. (1993) Bone physiology and the osteoporotic process. *Respiratory Medicine*, v.87, p.3-7.

SOUZA, S.A. (1977) *Ensaio mecânicos de materiais metálicos*. 3ed., São Paulo, Edgard Blücher.

SOUZA, S.A. (1982) *Ensaio mecânicos de materiais metálicos. Fundamentos teóricos e práticos*. São Paulo, Ed. Edgard Blücher.

SZEJNFELD, V.L. (2000) *Osteoporose : Diagnóstico e tratamento*, São Paulo: Ed. Sarvier, 406 p.

WHO STUDY GROUP. (1994) *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis*. WHO Technical Report Series nº 843. Geneva: World Health Organization, p.1-129.

WHO STUDY GROUP (2003) Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 01/11/03.

WOOLF, A.D.; DIXON, A.S.J. (1988) *Um guia clínico - Osteoporose*. London: Martin Dunitz.

YU, B.P.; MASORO, E.J.; MURATA, I.; BERTRAND, H.A.; LYND, F.T. (1982) Life span study for SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol*, v.37, p.130-141. In: KALU, D.N., (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, v.15, p.175-192.

ZARROW, M.X.; YOCHIM, J.M.; MCCARTHY, J.L., SANBORN, R.C. (Eds), (1964) *Experimental Endocrinology: a sourcebook of basic techniques*. Academic Press, New York, p.136-137.

ZIOUPOS, P.; CURREY, J.D.; HAMER, A.J. (1999) The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.45, n.2, p.108-116.

REVISTAS ELETRÔNICAS

<http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>

<http://www.medscape.com>

ANEXOS

TABELA A - Valores do peso corporal, peso e comprimento dos fêmures.

TABELA B - Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de flexão de três pontos.

TABELA C - Valores da área, linha neutra, momento de inércia e tensão.

TABELA A - Valores do peso corporal, peso e comprimento dos fêmures.

Grupo	Peso Corporal (g)		Peso do Fêmur (g)		Comprimento do Fêmur (mm)	
	INICIAL	FINAL	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO
30A	260	320	0,84	0,90	36	38,3
30B	230	310	0,79	0,80	37,8	36,8
30C	260	310	0,93	0,93	37,6	36,3
30D	260	340	0,88	0,96	37	37,6
30E	270	370	0,98	0,96	37,6	37,8
45A	210	280	0,82	0,63	36,4	33,4
45B	220	320	0,86	0,91	36,1	36
45C	240	330	1,07	1,11	38,4	38,5
45D	240	320	0,85	0,88	37,2	32,2
45E	240	330	0,96	0,95	37,7	37,7
60A	210	210	0,73	0,83	36,9	36,8
60B	270	340	1,09	1,12	39,2	41,7
60C	260	310	0,92	0,92	39,7	39,7
60D	270	340	0,86	0,85	38,6	37,9
60E	300	490	0,96	0,97	40	40
75A	270	400	1,04	1,01	38,1	38
75B	250	310	0,94	0,92	39,7	39,9
75C	210	270	0,78	0,79	37,1	37,3
75D	260	370	0,77	0,77	36,6	37,5
75E	260	350	0,62	0,87	33,7	37,6
90A	220	310	0,96	0,92	37,2	36,1
90B	240	300	0,93	0,92	38	37,7
90C	240	320	0,95	0,94	37,9	37,3
90D	270	350	0,87	0,86	36,4	36,2
90E	250	330	0,99	1,04	38,4	38,3
105A	250	340	0,96	0,89	38,4	40,5
105B	230	310	0,88	0,70	38,6	35,9
105C	230	310	0,95	0,97	38,6	38,6
105D	270	360	1,06	1,01	40,1	40

TABELA B - Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de flexão de três pontos.

GRUPO	ANIMAL	LIM. PROPORCIONAL		LIMITE MÁXIMO		RIGIDEZ (x10(3) N/m)
		C. Aplicada (N)	Deformação (10(-3)m)	C. Aplicada (N)	Deformação (10(-3)m)	
30	AD	108,563	0,530	123,578	0,70	184,0
	AE	73,804	0,337	105,791	0,68	210,9
	BD	60,713	0,398	80,287	0,80	145,3
	BE	61,555	0,359	79,625	0,68	164,1
	CD	73,804	0,394	95,183	1,02	180,5
	CE	74,800	0,362	90,234	0,74	200,1
	DD	71,355	0,296	102,165	0,66	231,7
	DE	68,445	0,309	103,684	0,80	213,7
	ED	100,218	0,583	111,965	0,80	162,0
	EE	84,829	0,332	120,981	0,70	248,0
45	AD	61,249	0,283	97,265	0,64	194,2
	AE	65,995	0,314	91,042	0,68	201,6
	BD	65,000	0,284	95,354	0,66	218,0
	BE	64,311	0,269	102,092	0,64	228,0
	CD	76,637	0,310	103,782	0,58	238,4
	CE	76,484	0,318	100,524	0,74	231,6
	DD	76,637	0,378	94,840	0,58	195,7
	DE	69,594	0,310	94,080	0,58	215,7
	ED	58,492	0,274	104,787	0,68	205,7
	EE	69,441	0,329	105,816	0,64	202,2
60	AD	61,402	0,354	89,131	0,76	165,2
	AE	43,563	0,246	69,776	0,66	165,8
	BD	67,909	0,319	118,262	0,82	204,3
	BE	77,786	0,319	115,885	0,90	236,2
	CD	67,909	0,319	99,862	0,80	205,9
	CE	74,953	0,321	108,315	0,68	224,9
	DD	65,995	0,301	105,938	0,78	210,5
	DE	64,541	0,308	91,900	0,62	200,5
	ED	71,201	0,314	112,896	0,70	218,4
	EE	64,847	0,290	126,665	0,78	215,2
75	AD	70,742	0,338	94,031	0,92	201,3
	AE	62,856	0,302	96,261	0,82	199,1
	BD	71,201	0,301	98,858	0,82	227,6
	BE	77,097	0,319	92,267	0,78	232,6
	CD	57,114	0,301	79,846	0,58	180,0
	CE	59,641	0,385	72,839	0,72	152,2
	DD	61,095	0,299	91,851	0,62	195,4
	DE	59,794	0,301	88,102	0,64	189,9
	ED	56,349	0,254	100,842	0,66	214,5
	EE	58,799	0,306	78,351	0,62	183,8

90	AD	66,684	0,324	96,849	0,62	197,2
	AE	57,832	0,284	90,430	0,68	194,2
	BD	63,163	0,364	96,138	0,80	166,5
	BE	63,852	0,359	83,888	0,64	168,9
	CD	68,751	0,362	105,056	0,70	183,0
	CE	70,742	0,334	102,655	0,76	204,1
	DD	69,900	0,320	92,194	0,60	210,1
	DE	73,498	0,367	87,808	0,58	192,6
	ED	80,082	0,361	117,821	0,76	214,5
	EE	74,953	0,380	98,784	0,70	189,8
105	AD	57,956	0,301	92,806	0,72	183,3
	AE	63,698	0,298	96,775	0,72	218,8
	BD	73,498	0,363	97,535	0,86	194,9
	BE	56,119	0,236	103,782	0,68	226,4
	CD	57,956	0,263	94,301	0,82	210,9
	CE	61,095	0,259	98,294	0,82	225,5
	DD	51,908	0,222	84,452	0,72	221,1
	DE	52,214	0,250	93,541	1,00	197,6

TABELA C - Valores da área, linha neutra, momento de inércia e tensão.

Grupo	ANIMAL	ÁREA (mm²)	LINHA NEUTRA (mm)	MOMENTO INÉRCIA (mm⁴)	TENSÃO (MPa)
30	A	7,204	1,70	8,015	262
	B	5,723	1,51	3,927	310
	C	6,911	1,62	5,899	261
	D	4,952	1,56	4,333	367
	E	6,830	1,82	7,161	285
45	A	6,167	1,61	5,521	284
	B	5,372	1,48	4,226	335
	C	6,149	1,84	6,692	286
	D	5,331	1,58	4,487	335
	E	6,686	1,77	6,946	268
60	A	4,683	1,75	5,180	301
	B	6,222	1,94	8,064	285
	C	6,405	1,58	6,251	253
	D	6,195	1,65	5,598	312
	E	6,310	1,69	7,129	268
75	A	5,506	1,90	6,535	274
	B	5,600	1,76	5,274	329
	C	4,579	1,65	4,228	312
	D	4,641	1,56	3,827	375
	E	5,540	1,57	5,356	296
90	A	5,772	1,74	6,701	252
	B	6,218	1,65	5,593	284
	C	4,960	1,71	4,804	374
	D	6,395	1,71	6,458	244
	E	6,274	1,68	6,159	321
105	A	5,953	1,62	5,950	253
	B	6,164	1,57	6,523	235
	C	5,511	1,91	6,479	266
	D	4,894	1,72	5,427	268