UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INTERUNIDADES BIOENGENHARIA

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**MODELO DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E SEU
EFEITO EM ALGUMAS PROPRIEDADES MECÂNICAS
DO OSSO DO RATO**

ADRIANA VALADARES DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2002

MODELO DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E SEU EFEITO EM ALGUMAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO DO RATO

Adriana Valadares da Silva

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, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José B. Volpon

**Ribeirão Preto
2002**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586m Silva, Adriana Valadares da
Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato / Adriana Valadares da . -- São Carlos, 2002.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2002.
Área Interunidades : Bioengenharia.
Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon.

1. Simulação de microgravidade. 2. Propriedades mecânicas. 3. Suspensão pela cauda. 4.Osso. 5. Ratos.
I. Título.

Ao meu esposo Márcio, com muito carinho, pelo amor e compreensão; aos meus pais Laércio e Elza que se dedicaram à minha formação, demonstrando sempre muito amor, carinho e um verdadeiro exemplo de luta e perseverança. Aos meus familiares, pela amizade, apoio e incentivo incondicionais.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me proporcionado elaborar este trabalho.

Ao Prof. Dr. José B. Volpon, pela oportunidade que me foi dada, pelos ensinamentos, amizade e pelo valioso exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Dr. Antônio Carlos Shimano, pela amizade e participação na elaboração desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório: Terezinha, pela amizade sincera; Francisco e Luiz Henrique, pelo auxílio na fase experimental e amizade inestimável e ao Eng. Moro pela colaboração.

Aos amigos Marcos Shimano, pela ajuda e colaboração durante a realização desse trabalho, e Marcos Lara, pelo auxílio durante a fase experimental.

Aos amigos, Marinheiro, Adriana, Rosângela, Ricardo e Vitor, pela grande amizade.

Aos amigos do curso de Fisioterapia da Universidade de Franca pelo incentivo na realização deste trabalho.

À secretária do Laboratório de Bioengenharia da EESC-USP, Janete dos Santos, pela cordialidade no atendimento aos pós-graduandos.

A todos meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tecido ósseo.....	2
1.2 Alterações observadas durante períodos de exposição á microgravidade.....	4
1.3 Modelos utilizados para simulação de microgravidade.....	7
1.4 Propriedades mecânicas do osso	15
1.5 Ensaio mecânico.....	18
1.5.1 Ensaio de flexão em três pontos	19
1.6 Objetivo	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Grupos experimentais	24
2.2 Técnica de suspensão.....	25
2.2.1 Preparo do animal.....	25
2.2.2 Gaiola Utilizada.....	28
2.3 Ensaio mecânico.....	35
2.3.1 Preparo para o ensaio mecânico	35
2.3.2 Ensaio de flexão em três pontos	36
2.3.3 Análise dos parâmetros mecânicos.....	38
2.3.4 Análise estatística	38
3 RESULTADOS	40
3.1 Peso dos animais	42
3.2 Carga no limite elástico.....	44
3.3 Deflexão no limite elástico	45
3.4 Carga no limite máximo.....	46
3.5 Deflexão no limite máximo	47
3.6 Rigidez	48
3.7 Resiliência.....	49
4 DISCUSSÃO.....	50
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Modelo de suspensão	09
FIGURA 2 – Modelo de suspensão	13
FIGURA 3 – Configuração do carregamento no ensaio de flexão	20
FIGURA 4 – Gráfico carga x deflexão, a partir do qual são obtidas as propriedades mecânicas do ensaio de flexão em três pontos	21
FIGURA 5 – Quadro da representação esquemática do agrupamento dos animais.	25
FIGURA 6 – Material utilizado no sistema de fixação do animal. (A) Tintura de benjoin, (B) espuma adesiva, (C) barbante, (D) presilha, (E) elástico, (F) faixa elástica adesiva	26
FIGURA 7 – Cauda do animal com espuma adesiva	26
FIGURA 8 – Preparação do animal para suspensão. A cauda foi envolvida com faixa elástica adesiva e na extremidade esparadrapo, elástico e barbante	27
FIGURA 9 – Sistema de fixação completo. (A) Cauda do animal envolvida com espuma adesiva e faixa elástica, (B) esparadrapo, (C) barbante, (D) elástico, (E) presilha	28
FIGURA 10 – Vista de frente do conjunto composto pelas caixas de acrílico e metálica encaixadas pelas aberturas e formando a gaiola de contenção	29
FIGURA 11 – Vista da gaiola ilustrando todo o sistema de suspensão. Demonstração da gaiola utilizada: (A) caixa de acrílico, (B) caixa metálica.	30
FIGURA 12 – Material utilizado para o sistema de suspensão: (A) Haste de aço rosqueada, (B) duas “porca borboleta”, (C) arruelas, (D) porcas, (E) presilha	31
FIGURA 13 – (A) Eixo de suspensão montado com todos os acessórios, (B) Detalhe da presilha que desliza no eixo e serve de acoplamento do animal, (C) Detalhe do sistema de bloqueio pra delimitação da excursão da presilha.	32
FIGURA 14 – Detalhe da fixação do eixo de suspensão às grades da gaiola	32
FIGURA 15 – Animal colocado em suspensão. As patas traseiras sem contato com a base ou com as laterais da gaiola	33

FIGURA 16 – Ilustração do posicionamento do animal e o acesso à (A) água e (B) ração.	34
FIGURA 17 – Par de ossos obtidos para o ensaio mecânico mostrando a tíbia e fíbula limpas de partes moles adjacentes.	35
FIGURA 18 – Detalhe do posicionamento do conjunto tíbia-fíbula para a realização do ensaio de flexão. A força é aplicada na tíbia.	37
FIGURA 19 – Peso dos animais: média do peso inicial e final de todos os grupos antes e após a suspensão	43
FIGURA 20 – Média do peso das peças (tíbia-fíbula) dos animais de todos os grupos	43
FIGURA 21 – Comparação entre os valores médios das cargas no limite elástico nos diferentes grupos.	44
FIGURA 22 – Comparação entre os valores médios das deflexões no limite elástico nos diferentes grupos.	45
FIGURA 23 – Comparação entre os valores médios das cargas no limite máximo nos diferentes grupos.	46
FIGURA 24 – Comparação entre os valores médios das deflexões no limite máximo nos diferentes grupos.	47
FIGURA 25 – Comparação entre os valores médios da rigidez nos diferentes grupos.	48
FIGURA 26 – Comparação entre os valores médios da resiliência nos diferentes grupos.	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores médios do peso dos animais.....	40
TABELA 2 – Valores médios do peso das peças.	41
TABELA 3 – Valores das médias e desvios padrão das propriedades mecânicas das peças dos animais dos grupos experimentais.	41

RESUMO

SILVA, A.V.da. *Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato*, Ribeirão Preto, 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002.

A manutenção do metabolismo mineral normal dos ossos é um resultado de vários fatores inclusive as solicitações mecânicas que são aplicadas aos ossos pelas contrações musculares e força da gravidade. O propósito desta investigação foi estudar um modelo de suspensão de rato pela cauda que simulasse assim as alterações esqueléticas que podem acontecer em um ambiente de microgravidade. O modelo foi analisado em termos de tolerância do animal e os efeitos sobre a resistência mecânica do complexo tíbia-fíbula. Após a realização do ensaio de flexão em três pontos foram obtidos os principais parâmetros mecânicos (carga e deflexão no limite máximo, carga e deflexão no limite elástico, rigidez e resiliência). Foram utilizadas cinquenta e três ratas fêmeas, distribuídas em quatro grupos conforme o período de suspensão (controle, 7, 14 e 21 dias). O modelo de suspensão mostrou-se eficaz com boa adaptação dos animais e promoveu um enfraquecimento significativo nos ossos principalmente no período de 21 dias.

Palavras-chave: simulação de microgravidade; propriedades mecânicas; suspensão pela cauda; osso; ratos.

ABSTRACT

The maintenance of the normal metabolism of minerals in bone is a result of several factors including the mechanical demands that are applied to the bones by the muscle contractions and gravity force. The purpose of this investigation was to study a model of tail suspension of the rat thus simulating the skeletal alterations that may occur in a microgravity environment. The model was analyzed in terms of animal tolerance and the ensuing effects on the mechanical resistance of the tibiofibular complex. After a three-point bending test in flexion the main mechanical parameters were obtained, (load and deflection at the ultimate limit, load and deflection at the yielding point, stiffness and resilience). Fifty-three adult female rats were used and distributed in four groups according to the length of time in suspension (control, 7, 14 and 21 days). The model of suspension was efficient with well adaptation of the animals and caused a significative weakness of bones mainly in the 21 day period.

Keywords: Microgravity simulation, mechanical properties, tail suspension, bone, rat.

1 INTRODUÇÃO

Há evidências significativas de que um ambiente destituído de estímulo mecânico produza efeitos diretos na estrutura e função ósseas. O sistema músculo-esquelético realiza adaptações para seu ambiente mecânico. Pôde-se observar durante a exposição de astronautas à microgravidade e em pacientes que permaneceram acamados, uma série de alterações que podem levar à perda de 1% a 5% da massa óssea (HOLICK, 1998).

O osso fornece sustentação interna para todo o corpo e inserção para músculos e tendões. Dependendo da carga a que ele é submetido suas características físicas podem variar muito (VICO, 1998).

De acordo com JOHNSON (1998) períodos de sete ou quatorze dias de ausência de contato com o solo são suficientes para promover alterações ósseas, principalmente naqueles que servem de apoio para o peso corporal como, por exemplo, o fêmur e a tíbia.

O sistema esquelético já não precisa de seu conteúdo de cálcio para manter sua integridade estrutural e isso poderá resultar em fraturas após o retorno às atividades normais (BURGER & KLEIN-NULEND, 1998).

Os estudos durante missões espaciais são de difícil elaboração. Por isso, durante muito tempo, grupos de pesquisadores estudaram vários modelos de simulação de microgravidade e concluíram que o modelo de suspensão do rato pela cauda seria o ideal, simulando algumas mudanças fisiológicas e anatômicas que ocorrem naquele ambiente (MOREY-HOLTON & GLOBUS, 1998).

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação dos ossos.

As superfícies interna e externa dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. As principais funções do endóstio e do perióstio são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O esqueleto tem uma importante função metabólica e mecânica. A rigidez característica lhe permite a manutenção da forma corpórea, protegendo os tecidos moles e servindo de arcabouço para a medula óssea, bem como a transmissão de força muscular. O conteúdo mineral contribui para a regulação da composição do espaço extracelular, especialmente da concentração de cálcio iônico (BORELLI apud CARVALHO et al., 2000).

Um dos fatores responsáveis pela manutenção do metabolismo mineral normal dos ossos é a compressão longitudinal exercida sobre eles, produzida pelo efeito da gravidade sobre o arcabouço (RODAHL apud ASTRAND & RODAHL, 1980). A pressão estimula o crescimento ósseo por oposição. A descarga de peso

resultará em maior espessura do osso e maior densidade da diáfise (ASTRAND & RODAHL, 1980).

Portanto, a remodelação óssea é extremamente sensível a alterações de tensões mecânicas geradas dentro do tecido ósseo. Cada osso depende de uma quantidade de estímulo diferente para se remodelar constantemente (RUBIN & LANYON, 1987).

A aplicação de forças mecânicas durante uma atividade física normal pode ser definida como estímulo mecânico e pode causar uma pequena deformação na arquitetura óssea, o que estimula a osteogênese. A atividade física pode atuar diretamente na formação óssea. Já a imobilização leva a um processo de reabsorção do osso (TURNER, 1999; HART et al., 2001).

Estudos do efeito do repouso prolongado no leito sobre o metabolismo do cálcio (RODAHL et al. apud ASTRAND & RODAHL, 1980) mostraram que o aumento de cálcio na excreção urinária que ocorre durante um confinamento prolongado ao leito não é devido à inatividade mas sim à ausência de compressão longitudinal sobre os ossos longos. Se a excreção urinária de cálcio pode ser entendida como uma indicação de desmineralização óssea, parece que a tensão gravitacional sobre os ossos longos é essencial para o crescimento ósseo normal. Isso foi consubstanciado, após estudos sobre metabolismo do cálcio em astronautas durante os longos vôos espaciais (WHEDON *apud* ASTRAND & RODAHL, 1980).

Portanto, uma vez que os ossos sejam sensíveis a tensões mecânicas, a estrutura óssea pode ser modificada com alterações de gravidade ou ausência de contato com o solo (COWIN, 1998; BURGER & KLEIN-NULEND, 1998).

A excitação mecânica pode induzir mudanças nos osteoblastos, em ambientes de microgravidade ou em repouso prolongados na cama, quando surgem diminuição em massa óssea e alteração da arquitetura trabecular (GUIGNANDOM et al., 1997).

CARMELIET et al. (1998) observando astronautas e animais que permaneceram em condições de microgravidade, concluíram, após análises histológicas e bioquímicas, que aconteciam nos dois casos uma diminuição de formação óssea. Afirmaram, ainda, que a massa e a arquitetura do sistema esquelético se adaptam ao seu ambiente mecânico; portanto, ao sofrer uma descarga de peso suas propriedades mecânicas se alteram.

1.2 Alterações observadas durante períodos de exposição à microgravidade

Para que o homem possa viver ou explorar ambientes de diferentes climas ou atmosferas, precisa adaptar-se fisiologicamente a esses ambientes. Inúmeras pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de descobrir qual a influência da gravidade na nossa evolução e o papel que ela representa na fisiologia (MARTIN, 1988).

Durante exposição à microgravidade, mesmo por pouco tempo, são alterados os padrões de movimento e de força muscular. Todos os movimentos realizados com os membros inferiores ficam prejudicados e isso causa grande insegurança para se iniciar qualquer movimento. Portanto, é exigida menor força muscular para desencadear os movimentos de locomoção que são iniciados pelos membros superiores, o que altera até mesmo a postura. Essas impressões podem ser

confirmadas em gravações de vídeo realizadas durante missão espacial ou observando, em laboratório, o rato durante período de suspensão pela cauda, o qual permanece durante todo tempo em flexão plantar de tornozelo (MUSSACHIA et al., 1983).

Durante o vôos espaciais, desde os primeiros dias, puderam ser constatados sintomas como edema de face, congestão, diminuição de peso corporal que geralmente é reversível, desidratação, redução da capacidade de exercício e hipotensão postural (BALDWIN, 1995; WEST, 2000). Dentre outras alterações observam-se, ainda, alterações pulmonares, cardíacas, atrofia e fadiga muscular. Os astronautas sofrem um desequilíbrio de cálcio contínuo nas primeiras semanas de vôo espacial, o que resulta em redução da densidade óssea. Em missões muito longas, a perda de cálcio pode afetar outros sistemas além do sistema músculo esquelético (MIYAMOTO et al., 1998; MOREY, 1979).

Portanto, a exposição a ambientes de microgravidade afeta diretamente o sistema músculo-esquelético, alterando seu metabolismo. Esse ambiente gera uma baixa tensão sobre os ossos e, por consequência, menor massa óssea será necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto, o que poderá resultar em fraturas em ossos como, por exemplo, fêmur e tíbia (JONHSON, 1998; MOREY-HOTTON & GLOBUS, 1998). Essas fraturas normalmente não ocorrem durante a permanência em ambientes de microgravidade. Porém, em retorno às atividades normais o risco de fraturas é maior, pois o sistema esquelético terá que se adaptar novamente a um novo ambiente (HOLICK, 1998).

STEHLER (1998) analisou diminuição de densidade óssea durante missão espacial, por meio de análises histológicas e comprovou que ocorreu diminuição de

cálcio nos ossos de maneira similar à que ocorre em pacientes que permanecem longos períodos acamados. A causa mais provável dessa perda é a diminuição de carga sobre o sistema músculo esquelético. Porém, outras condições devem ser observadas como a nutrição dos astronautas e as condições emocionais (LEBLANC et al., 1998).

As experiências realizadas em vôo são muito limitadas. Por isso a NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) tem realizado diversos estudos na tentativa de determinar os mecanismos de atrofia muscular e desgaste ósseo, que acontecem em indivíduos expostos à microgravidade, tentando simular as condições em vôo espacial (MUSACCHIA et al., 1988).

A maioria dos experimentos para se estudar as alterações que acontecem no sistema músculo esquelético durante períodos de imobilização foi realizada em animais. Investigações em humanos poderiam limitar as análises das pesquisas (APPEL, 1990).

Os resultados dos estudos da perda de cálcio durante os vôos espaciais indicam que a perda urinária desse íon esteja relacionada ao tempo e duração de vôo (HALL, 1991).

Os estudos em que os animais são mantidos em suspensão ou hipocinesia têm sido executados tentando simular as condições que acontecem em vôos espaciais. Embora o método produza condições diferentes da imobilização (os animais podem realizar contrações dinâmicas, porém com carga mínima), as alterações podem ser observadas nos músculos e nos ossos de acordo com o tempo de exposição a essas situações (FITTS et al., 1986; MATSUMOTO et al., 1998).

1.3 Modelos utilizados para simulação de microgravidade

Vários modelos foram empregados para simular um ambiente de microgravidade. O sistema de elevação pelo corpo e o modelo de suspensão pela cauda do animal são os dois mais utilizados. KASPER et al. (1993) e MUSACCHIA et al. (1983) afirmaram que o modelo ideal seria aquele que permitisse livre mobilidade ao animal, porém com restrição aos movimentos dos membros posteriores, ou seja, o modelo de suspensão pela cauda do animal. Nessa situação os membros posteriores dos animais permanecem com livre movimentação, porém sem contato com o solo.

As pesquisas realizadas em vôos espaciais reais são de difícil realização e, por isso, a simulação de um ambiente de microgravidade é extremamente importante. De acordo com a pesquisa realizada por MOREY-HOLTON & GLOBUS (1998), animais que permanecem em situações de microgravidade simulada apresentam alterações fisiológicas semelhantes a animais que estiveram em vôos espaciais. Portanto, o modelo de suspensão de rato pela cauda é considerado um modelo efetivo para avaliar os mecanismos fisiológicos e celulares do sistema músculo-esquelético, que se alteram em resposta a um novo estímulo.

MOREY (1979) elaborou um modelo de suspensão com o objetivo de simular condições de vôo espacial e induzir osteopenia. O animal foi preso a uma malha ortopédica de maneira que as patas dianteiras permaneceram em contato com o solo e os membros posteriores livres para movimentação, porém sem contato com o solo. O animal foi preso a um arame e a um sistema de modelo giratório, preso a uma estrutura de alumínio. O animal pôde se movimentar em um ângulo de 360°,

portanto, teve capacidade para se alimentar, permanecendo em suspensão durante vinte dias consecutivos. Por meio de análises histológicas, verificou-se diminuição na formação óssea, atrofia muscular, alterações cardíacas e renais. Ficou evidenciado que o modelo de suspensão utilizado foi eficiente, simulando as mesmas alterações observadas durante permanência em ambiente de microgravidade. Esse autor encontrou dificuldades na execução do modelo de suspensão, como alterações na circulação venosa e ulcerações provocadas pelo sistema de suspensão.

MUSSACHIA et al. (1980) descreveram um método de suspensão, a partir do modelo criado por MOREY (1979), para avaliar atrofia muscular (FIG. 1). O modelo desenvolvido foi de elevação do animal pelo corpo. Nesse sistema o animal foi suspenso por um pedaço de pano de brim e prendedores de velcro, sendo que a cabeça e a cauda foram colocadas em aberturas feitas no tecido. O tecido utilizado para segurar o animal foi preso, com auxílio do velcro, a uma placa de alumínio que foi perfurada e conectada à região dorsal do animal. Essa placa foi presa a um sistema giratório, o que permitiu ao animal utilizar as patas dianteiras para se movimentar. Abaixo da gaiola foi colocado um coletor de urina e fezes para dosagem de cálcio. Os animais permaneceram em suspensão por períodos de sete e quatorze dias e a movimentação permitida na gaiola foi em um ângulo de 140°. Os autores analisaram atrofia muscular, alterações ósseas, taxa de excreção de urina e readaptação muscular após a suspensão. Os músculos foram avaliados em relação ao peso e propriedades histoquímicas. Pôde ser constatado que existiu atrofia muscular significativa e perda de peso em todos os músculos gastrocnêmio e sóleo dos animais, a partir do sétimo dia de suspensão e, ainda, nesse período, foi detectado um aumento em perda de cálcio nas análises de urina e fezes. O modelo de suspensão

utilizado foi eficiente, pois os animais não apresentaram lesões durante o período em que permaneceram em suspensão.

FIGURA 1 – Modelo de suspensão.

FONTE – MUSACHIA, X.J. et al., 1980.

JASPERS & TISCHLER (1984) desenvolveram um modelo que consistiu em uma armação de suspensão. Foi utilizado um suporte de metal para estabilizar os anexos da gaiola. O animal foi preso a um clipe metálico fixado em sua calda com auxílio de uma fita ortopédica e preso a um sistema de fixação. A movimentação permitida era em ângulo de 360°. Os autores analisaram o consumo de ração, a taxa de crescimento dos animais e as alterações musculares que foram avaliadas pelo peso dos músculos, do conteúdo de proteínas e análises histológicas. Foi constatada diminuição de peso dos músculos gastrocnêmio, sóleo e plantar e diminuição do crescimento ósseo que foi significativa somente após seis dias de suspensão. Todos os animais perderam peso somente nos primeiros dias, depois retornaram ao peso

inicial. Os autores concluíram, ainda, que o modelo utilizado para a realização da suspensão apresentou limitações e deve ser utilizado somente quando a suspensão não exceder seis dias e os animais pesarem, no máximo, 200 gramas.

WINIARSKIS et al. (1986) utilizaram em seu experimento ratas fêmeas com peso aproximado de 200-250 gramas. Para a suspensão foi utilizado o modelo descrito por MOREY (1979), porém com algumas modificações. Nesse modelo foi utilizada uma fixação feita na cauda do animal, por meio de uma tira de couro, presa a uma roldana que foi colocada no topo da gaiola. A altura da roldana foi ajustada de modo a permitir que o animal se movimentasse livremente sem utilizar os membros posteriores. O animal pôde movimentar-se em ângulo de 360° e foi analisado após quatro semanas de suspensão. Esse estudo avaliou, por meio de análises histológicas, as alterações musculares, e os resultados mostraram que os músculos sóleo e gastrocnêmio diminuíram de peso e apresentaram atrofia significativa. O modelo de suspensão mostrou-se eficiente e não prejudicou a saúde do animal.

FITTS et al. (1986) analisaram músculos de ratos suspensos pela cauda e músculos de ratos que permaneceram com imobilização gessada, durante uma e duas semanas. O sistema de suspensão utilizado tinha formato de triângulo intercalado entre duas capas de pano de brim coladas ao terço proximal da cauda do animal com bandagem elástica adesiva. Esse procedimento foi realizado até a metade da cauda, sendo que o restante permaneceu livre, pois o método utilizado distribuiu o peso do animal ao longo da cauda. Foi utilizada uma roldana presa a um sistema de suspensão cuja altura foi ajustada de modo a impedir que o animal tocasse o solo com as patas traseiras. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração, pois mantiveram as patas dianteiras em contato com o solo. O modelo de suspensão

mostrou-se eficiente para realização do estudo proposto. Foram realizadas análises bioquímicas e histológicas e pôde-se concluir que houve atrofia muscular nos animais imobilizados com gesso e nos que permaneceram em suspensão, porém nos músculos sóleo e gastrocnêmio a atrofia foi maior no grupo suspenso.

Segundo DESPLANCHES et al. (1987), os métodos de suspensão mais utilizados são os elaborados por MOREY (1979) e MUSSACHIA et al. (1980). Para análise realizada desse experimento os animais permaneceram em suspensão durante sete, quatorze e vinte e um dias, utilizando o método de suspensão elaborado por MOREY (1979). Foram utilizados 58 ratos e, após o sacrifício, foi realizada análise bioquímica e histológica, através da qual pôde ser observada atrofia muscular principalmente no músculo sóleo.

MARTIN et al. (1988) fizeram análise em animais que permaneceram em vôo espacial e animais que permaneceram em simulação de microgravidade. Cada animal teve seu espaço delimitado: 10,8cm de largura, 10,5cm de comprimento e 26,7cm de altura. Enquanto os animais permaneciam em vôo, eram mantidos, nas mesmas condições (tamanho da gaiola, temperatura, iluminação, água e ração), outros seis animais que permaneceram em suspensão pela cauda. O modelo utilizado para a suspensão foi o mesmo citado por FITTS et al. (1986). Por meio, da análise histológica, foi constatada atrofia muscular significativa e diminuição de peso nos músculos sóleo e gastrocnêmio nos dois grupos.

ABRAM et al. (1988) utilizaram o método de suspensão pelo corpo e analisaram as mudanças histomorfométricas e mecânicas do osso que ocorrem sem a ação do peso corporal. Foram realizados testes de flexão e torção em fêmures

intactos. O grupo experimental apresentou baixa densidade e menores propriedades mecânicas, resultando em diminuição da massa óssea.

KASPER et al. (1990) utilizaram o mesmo modelo citado por MUSSACHIA et al. (1980) sendo que as medidas da gaiola foram de 21cm de largura, 26.5cm de comprimento e 21cm de altura. Os autores analisaram as adaptações morfológicas do músculo sóleo durante o período de suspensão e o efeito do exercício no período de recuperação. Pela análise histológica foi constatada atrofia muscular em todos os animais, após suspensão de quatro, sete, quatorze e vinte e oito dias. Os animais exercitados apresentaram lesões musculares, sendo que o grupo que permaneceu em suspensão por sete dias obteve melhor recuperação. O modelo utilizado para a suspensão não foi eficiente, pois os animais apresentaram úlceras na região axilar.

KASPER et al. (1993) elaboraram em sistema de suspensão a partir do modelo utilizado por MOREY (1979). O modelo portanto, consiste em um sistema de roldana preso a um sistema de suspensão (FIG. 2). Foi utilizado um modelo de suspensão pela cauda do animal. A cauda foi lavada com água morna e sabão e, em seguida, foi aplicada tintura de Benjoim. Ainda, na cauda do animal, foi aplicada fita de tração ortopédica e, em seguida, um bloco para cobrir a fita do ponto mais alto da cauda onde também foi fixado um dispositivo que foi preso ao sistema de roldana. A roldana foi fixada a um fio de aço colocado no topo da gaiola. A altura foi escolhida de modo que animal não conseguisse apoiar as patas traseiras no assoalho da gaiola ou nas laterais. Os animais permaneceram em suspensão por períodos de 7, 14 e 28 dias consecutivos. Nesse estudo foram analisadas, por meio de análise histológica, as alterações musculares ocorridas durante o período de suspensão e foi constatada atrofia muscular progressiva e significativa nos músculos sóleo e gastrocnêmio, no

grupo que permaneceu vinte e oito dias suspenso, sendo que a atrofia pôde ser observada desde os sete primeiros dias. Os autores sugerem que seja feito um estudo adicional para avaliar os efeitos do exercício durante o período de recuperação. Quanto à análise do modelo de suspensão, os autores relataram que foi eficaz, pois promoveu limitação dos movimentos sem prejudicar a saúde geral do animal.

FIGURA 2 - Modelo de suspensão.
FONTE – KASPER, C.L. et al., 1993.

MOREY-HOTON & GLOBUS (1998) procuraram elaborar um modelo de suspensão que preservasse a saúde do animal, que permitisse livre movimentação dos membros posteriores, porém sem apoio e o padrão de alterações deveria ser semelhante ao que acontece em vôo espacial. O sistema utilizado foi elaborado baseado no modelo de MUSSACHIA et al. (1980). Somente o tecido de brim e o velcro foram substituídos por uma fita de tração ortopédica, colocada na cauda do animal. Foram analisadas as alterações ósseas ocorridas durante o período de

suspensão, por meio de análises histológicas e bioquímicas, e pôde ser comprovado que ocorria diminuição do número de osteoblastos desde as primeiras semanas. Os autores analisaram, ainda, as propriedades mecânicas do fêmur e tíbia. Concluíram que houve alteração da integridade estrutural e alteração das propriedades analisadas. Portanto, a resistência mecânica dos ossos foi alterada o que aumenta o risco de fraturas. O modelo foi efetivo para avaliar os mecanismos celulares utilizados pelo sistema esquelético para adaptação à condição de simulação de microgravidade.

MATSUMOTO et al. (1998) utilizaram um modelo semelhante ao de KASPER et al. (1993). Uma tira elástica foi aplicada na cauda do animal e foi fixada com bandagem elástica adesiva que foi fixada a um sistema de roldana presa em uma barra de aço colocada no alto da gaiola. A altura foi ajustada, permitindo ao animal livre acesso à água e à ração. Os animais permaneceram em suspensão durante 14 dias consecutivos. O objetivo foi avaliar a influência, no fêmur, da ausência de contato com o solo ou ausência de estímulo mecânico diante da simulação de microgravidade. Observaram uma redução contínua na formação óssea de todos os ossos analisados histologicamente. O modelo de suspensão utilizado não apresentou complicações e ainda propicia estudos futuros para prevenção e tratamento de alterações ósseas provocadas por ausência de estímulo mecânico.

VICO (1998) comparou animais que permaneceram em vôo espacial durante quatro e vinte e um dias, com animais que permaneceram em suspensão, a partir do modelo citado por KASPER et al. (1993). Verificou, pela análise histológica, diminuição na formação e crescimento ósseo, desde os primeiros dias de suspensão, nos dois grupos. A técnica utilizada para suspensão mostrou-se eficaz para realização do estudo.

MATZUURA et al. (2001) adaptaram um modelo a partir do descrito por MOREY (1979), utilizando uma fita ortopédica que foi presa à cauda do animal e, em seguida, presa ao sistema de suspensão. Os animais permaneceram em suspensão durante duas semanas após compressão de nervo ciático. Com análises histológicas e bioquímicas, pôde-se observar que a lesão provocada antes da suspensão provocou, entre outras alterações, diminuição de massa muscular. O período de suspensão auxiliou na regeneração da lesão causada ao nervo ciático, pois os animais permaneceram imobilizados. O modelo de suspensão utilizado provocou em alguns animais pequenas úlceras nas regiões axilares.

Os modelos animais são importantes para o estudo de alterações musculares e ósseas, pois permitem a realização de movimentos sem excitação mecânica, o que se assemelha à exposição de astronautas à microgravidade e a pacientes que permanecessem longos períodos na cama ou que são imobilizados com gesso. Os modelos de suspensão continuam sendo modificados para simular condições humanas de movimento em ambientes de microgravidade com maior precisão (KASPER, 1993).

1.4 Propriedades mecânicas do osso

O esqueleto é um sistema mecânico que suporta cargas. A direção e intensidade das deformações dependem da direção e grandeza da carga, da geometria e das propriedades mecânicas e materiais do tecido ósseo (CARTER & SPLENGER, 1978; FUNG, 1981; McALISTER & MOYLE, 1983).

O tecido ósseo possui, além de suas atividades biológicas, a importante função de suportar cargas. Não se pode estudá-lo como material de engenharia simples, pois como tal permaneceria inalterado, ou se alteram muito pouco ao longo do tempo sob a influência de agentes externos. O osso mantém-se em processo contínuo de remodelação, por meio do qual a estrutura se adapta às tensões a ela aplicadas ao longo do tempo (CURREY, 1988). O entendimento dessa característica é fundamental para a compreensão de suas propriedades mecânicas (GOULD, 1993). O formato do osso é influenciado pela compressão e deformação causadas pelas descargas de peso. Essas descargas se assemelham-se a vigas levemente curvadas para que as tensões de flexão possam ser minimizadas (CURREY, 1988). A geometria das metáfises permite a transferência de cargas aplicadas nas superfícies articulares dos ossos compactos das diáfises. Os locais de inserção de tendões e ligamentos no osso provêm um meio de transferir cargas da articulação para a diáfise cortical. O propósito do modelamento ósseo é modificar a forma e ajustar a massa de um osso para que possa resistir às tensões nas atividades diárias (SINGH, 1978). O apoio de carga ou peso e a contração muscular são duas solicitações que desempenham papel importante na modelagem do osso (CORNWALL, 1984).

A resistência óssea pode ser alterada pelas modificações do material e propriedades geométricas do osso. As propriedades materiais incluem a porcentagem da porção orgânica e inorgânica do osso, o número de ligações cruzadas ao longo das fibras colágenas e a orientação destas em relação à orientação das cargas aplicadas (EVANS & VINCENELLI, 1969).

As propriedades geométricas são tão importantes na análise do comportamento mecânico dos ossos quanto a sua composição (porosidade e

mineralização) e organização (arquitetura do osso trabecular ou cortical e orientação das fibras de colágenos). Propriedades geométricas constituem a resistência estrutural do osso, como a quantidade da área cortical e subperiosteal, o plano do momento de inércia máximo, que seria a superfície com maior resistência á flexão (MARTIN, 1988; GOULD, 1993).

O crescimento ósseo está relacionado, segundo a Lei de Wolff, às tensões e deformações localizadas no osso, ou seja, a capacidade do osso adaptar-se às mudanças de tamanho, forma e estrutura, em dependência das tensões mecânicas. Se a tensão diminui, ocorre a reabsorção do osso periosteal e subperiosteal com subsequente diminuição em resistência e rigidez. Se o osso está sujeito a altas tensões mecânicas, concernentes a um índice fisiológico normal, ele pode hipertrofiar-se com um aumento na densidade óssea. Portanto, a Lei de Wolff resumidamente diz: *“a forma e a estrutura de um osso são reflexos das forças solicitadas e solicitações a que está submetido”* (COWIN, 1998).

A dificuldade em examinar a estrutura óssea, utilizando as leis da mecânica é que estas leis são descritas para corpos que possuem uniformidade estrutural: como o osso é anisotrópico, ocorrem variações das propriedades mecânicas. Por isso, uma variável a ser considerada é a morfologia do osso, para que as características ósseas sejam melhor avaliadas (COWIN, 1998).

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

O comportamento mecânico do osso pode ser estudado pela realização de ensaios mecânicos do tecido ósseo, que podem ser corpo de provas retirados do osso em dimensões e geometria definidas com o ensaio a ser realizado, ou ainda pelo exame do comportamento mecânico do osso como uma unidade anatômica inteira (osso inteiro), determinando as contribuições das suas propriedades estruturais (GOULD, 1993).

1.5 Ensaio mecânico

Os ensaios mecânicos realizados em ossos apresentam grande variação de resultados que dependem de fatores como qual o osso a ser estudado, a região do osso estudada (epífise, metáfise e diáfise), condições em que a amostra foi preparada e ainda, o animal em estudo e o tipo de tratamento a que ele foi submetido (SEDLIN, 1965).

Uma vez que o esqueleto funciona como um sistema que suporta cargas e é submetido a um complexo de forças causadoras de deformações (McALISTER & MOYLE, 1983), a Biomecânica apresenta-se como um valioso instrumento de medida no estudo e compreensão desses eventos e suas conseqüências, atuando, portanto, como elo fundamental entre as ciências exatas e as biológicas (PESSAN, 1996).

Sendo assim, o conhecimento das características de resistência de alguns materiais é importante na Ortopedia e Medicina Esportiva. Materiais biológicos tais como músculo, osso, ligamento, tendão e cartilagem, necessitam de otimização de sua resistência para evitar ruptura. A Engenharia colabora na avaliação das

propriedades mecânicas dos tecidos biológicos ou dos materiais que são utilizados para substituir ou reparar alguma parte do corpo (GOULD, 1993).

A importância das propriedades mecânicas fez com que, em 1640, GALILEU GALILEI iniciasse os estudos das características mecânicas dos ossos longos em vários animais. A partir daquela data, vários autores, utilizando cada qual uma determinada técnica e objetivo, buscaram maiores informações e conhecimento do osso como material biológico (SHIMANO, 1994).

A determinação das propriedades mecânicas de um material pode ser realizada por meio de vários tipos de ensaios, como tração, compressão, flexão entre outros. Esses podem ser destrutivos, quando promovem a ruptura ou inutilização do material ou não destrutivos, em casos contrário (SOUZA, 1974).

Outra forma de classificar os ensaios mecânicos é com relação a velocidade de carregamento, que poderá ser estático ou dinâmico (EINHORN, 1996).

1.5.1 Ensaio de flexão em três pontos

Os ensaios de flexão são importantes, pois fornecem parâmetros fundamentais das propriedades mecânicas dos ossos (SIMKIN & ROBIN, 1973).

Segundo FRACCAROLI (1981) o ensaio de flexão em três pontos tem as vantagens de ser simples e dispensar acessórios especiais, além do fato de que tensões de flexão são esforços que surgem normalmente no osso longo durante seu funcionamento.

O ensaio consiste em apoiar o corpo de prova sob dois suportes distanciados entre si a uma distância L , sendo a carga de dobramento ou flexão aplicada no centro do corpo de prova (SOUZA, 1974) (FIG. 3).

FIGURA 3 – Configuração do carregamento do ensaio de flexão em três pontos.

A partir dos valores de carga e deflexão obtidos nos ensaios são construídas curvas carga $\times$ deflexão de onde são calculadas as propriedades de limite máximo, limite elástico, rigidez e resiliência (FIG. 4).

FIGURA 4 – Gráfico carga $\times$ deflexão, a partir do qual são obtidas as principais propriedades mecânicas do ensaio de flexão em três pontos.

-Limite máximo (LM)

O limite máximo é o maior valor da carga com a deflexão correspondente observada em cada ensaio (ponto máximo).

-Limite elástico (LE)

O limite elástico ou limite de proporcionalidade é o ponto de término da relação linear entre a carga e a deflexão. Após o limite elástico, o material sofre uma deformação permanente e tem início a região conhecida como fase plástica.

-Rigidez (R)

A rigidez é obtida pela tangente do ângulo formado entre a reta obtida na região linear e o eixo de deflexão. Quanto maior a rigidez, menor a deformação resultante da aplicação de uma tensão. A rigidez é dada pela equação:

$$R = \operatorname{tg} \theta = \frac{LE - A}{A - O}$$

-Resiliência (R')

Resiliência é a energia absorvida pelo material na fase elástica e é obtida, calculando-se a área abaixo da curva carga $\times$ deflexão na região elástica, delimitada pelo triângulo formado pelos pontos O-LE-A.

1.6 Objetivo

O objetivo geral deste estudo foi avaliar um modelo de suspensão de rato pela cauda que simulasse as alterações no esqueleto que ocorrem em um ambiente de microgravidade e analisar sua efetividade em termos de tolerância do animal à repercussão da suspensão sobre a resistência mecânica do osso.

O objetivo específico foi realizar ensaios mecânicos em flexão do complexo ósseo tíbia-fíbula após diferentes tempos de suspensão pela cauda e determinar a variação de algumas propriedades mecânicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ratas fêmeas adultas jovens da raça *Rattus Norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, com peso corporal médio de 250 gramas, fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Inicialmente os animais foram mantidos em gaiolas comuns, no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Ribeirão Preto-USP, em número de cinco em cada uma, e ao atingirem o peso desejado, foram transferidos para gaiolas individuais especiais. Nestas gaiolas foram mantidos com os membros posteriores suspensos de modo a permitir o apoio apenas com os membros anteriores para a locomoção e acesso à água e à ração.

O modelo de suspensão pela cauda do rato foi desenvolvido a partir da descrição de KASPER et al. (1993). Em estudo piloto prévio pôde-se observar que os animais toleraram bem a suspensão, sendo esse modelo considerado adequado ao experimento.

Os animais foram pesados no início e no final do experimento, antes do sacrifício. Os ossos de cada animal também foram pesados antes da realização do ensaio mecânico.

Foram utilizados para a suspensão 45 animais sendo que dois morreram, restando 43 para a avaliação final. Também utilizamos 10 animais que não ficaram em suspensão e foram considerados como controles.

2.1 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, conforme o tipo de tratamento (FIG. 5):

GRUPO 1 (CONTROLE): Constituído por animais que não receberam tratamento específico e com as mesmas características físicas iniciais dos animais tratados.

GRUPO 2: Os animais permaneceram em suspensão durante 7 dias e, em seguida, foram sacrificados e as tíbias associadas às fíbulas foram submetidas ao ensaio mecânico de flexão em três pontos.

GRUPO 3: Os animais permaneceram em suspensão durante 14 dias e, em seguida, foram sacrificados e as tíbias associadas às fíbulas foram submetidas ao ensaio mecânico de flexão em três pontos.

GRUPO 4: Os animais permaneceram em suspensão por 21 dias e, em seguida, foram sacrificados e as tíbias associadas às fíbulas foram submetidas ao ensaio mecânico de flexão em três pontos.

FIGURA 5 – Quadro da representação esquemática do agrupamento dos animais.

2.2 Técnica de suspensão

2.2.1 Preparo do animal

Para o processo de instalação da suspensão, os animais foram anestesiados com inalação de éter sulfúrico. Inicialmente, a cauda do animal foi lavada com água e detergente e, após estar seca, foi aplicada tintura de Benjoim em toda a pele da cauda (FIG. 6).

FIGURA 6 – Material utilizado no sistema de fixação do animal.

- (A) Tintura de Benjoim.
- (B) Espuma adesiva.
- (C) Barbante.
- (D) Presilha.
- (E) Elástico.
- (F) Faixa elástica adesiva

Em seguida, a cauda foi envolvida por uma espuma adesiva (Reston[®]) desde sua origem até os dois terços proximais, aproximadamente, com o objetivo de proteger a pele e evitar lesões cutâneas (FIG. 7).

FIGURA 7 – Cauda do animal envolvida com espuma adesiva

Sobre a espuma adesiva foi aplicada uma tira elástica adesiva que foi tensionada homogeneamente de modo a envolver toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocado uma fita elástica estreita que foi fixada por enfaixamentos da tira elástica adesiva e enfaixamentos adicionais de esparadrapo e barbante de modo a formar uma alça que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão(FIG. 8).

FIGURA 8 – Preparação do animal para suspensão. A cauda foi envolvida com faixa elástica adesiva, e na extremidade, com esparadrapo, elástico e barbante.

Em seguida, com o animal ainda anestesiado, a extremidade distal da sua cauda que não estava enfaixada foi amputada com auxílio de uma tesoura, com objetivo de evitar necrose no local durante o período que o animal fosse permanecer suspenso. Na FIG. 9, podemos visualizar a cauda do animal preparada para a suspensão e a presilha metálica, que fazia parte do eixo de suspensão, colocada na alça de elástico .

FIGURA 9 – - Sistema de fixação completo.
(A) Cauda do animal envolvida com espuma adesiva e faixa elástica adesiva.
(B) Esparadrapo.
(C) Barbante.
(D) Fita elástica.
(E) Presilha.

2.2.2 Gaiola Utilizada

O sistema de contenção dos animais foi constituído por uma gaiola composta por duas partes. A parte inferior foi formada por uma caixa de acrílico com 35cm de largura, 35cm de comprimento e 21,5cm de altura, aberta superiormente, fabricada em acrílico transparente, para permitir melhor visualização e controle do animal. Com auxílio de uma furadeira elétrica foi feita uma perfuração na lateral dessa caixa para introdução do bico do reservatório de água.

Sobre essa caixa de acrílico, foi colocada, em posição invertida, uma nova caixa de grade metálica com, 35,5cm de largura, 35,5cm de comprimento e 24cm de altura e também com aberturas. Essa caixa superior foi confeccionada com encaixes nas laterais para garantir perfeita fixação com a caixa de acrílico, sendo que em uma

das laterais foi amarrado um arame que serviu de suporte para a garrafa de água. Esse compartimento superior foi utilizado ainda como suporte para o sistema de fixação do animal. As duas caixas foram acopladas de modo que ficassem encaixadas pelas aberturas, formando um compartimento único (FIG. 10).

FIGURA 10 – Vista de frente do conjunto composto pelas caixas de acrílico e metálica encaixadas pelas aberturas e formando a gaiola de contenção.

O tamanho das gaiolas permitiu aos animais livre movimentação com os membros dianteiros, porém mantendo os membros posteriores suspensos, sem apoio no piso da gaiola ou nas suas laterais (FIG. 11).

FIGURA 11 – Vista da gaiola ilustrando todo o sistema de suspensão. Demonstração da gaiola utilizada:

(A) Caixa de acrílico.

(B) Caixa metálica

Após a montagem da gaiola, foi confeccionado um eixo de suspensão (FIG.

12).

FIGURA 12 – Material utilizado para o eixo de suspensão:

(A) Haste de aço rosqueada.

(B) Duas porcas borboleta.

(C) Arruelas.

(D) Porcas.

(E) Chapas de alumínio.

(F) Presilha.

O sistema de fixação foi composto basicamente por uma haste rosqueada de aço retilínea, com 40cm de comprimento e 4,5cm de diâmetro. Na região central dessa haste foi encaixada uma presilha que tinha, na outra extremidade, um encaixe para a alça elástica que fazia parte do sistema de acoplamento do animal (FIG. 13B).

Foi colocada em cada extremidade da haste, uma pequena chapa de alumínio fixada com duas “porcas” para delimitar o espaço de movimentação do animal no interior da gaiola (FIG. 13C), sendo que o limite de curso para o animal se movimentar foi de 25cm. Essa haste foi fixada transversalmente na gaiola superior, no maior diâmetro, tendo vários acessórios compostos por porcas, arruelas e porcas borboleta (FIG. 13A), com a finalidade de fixá-la às grades da gaiola e permitir o ajuste da sua lateral (FIG. 14).

**FIGURA 13 – (A) Eixo de suspensão montado com todos os acessórios.
(B) Detalhe da presilha que desliza no eixo e serve de acoplamento do animal.
(C) Detalhe do sistema de bloqueio para delimitação da excursão da presilha.**

FIGURA 14 – Detalhe da fixação do eixo de suspensão às grades da gaiola.

Após a preparação, e montagem completa da gaiola, os animais foram colocados em suspensão. A presilha colocada na barra de suspensão foi presa ao elástico fixado à cauda do animal. A haste de aço era regulável o que permitiu um ajuste da altura de acordo com o tamanho de cada animal (FIG. 15).

FIGURA 15 – Animal colocado em suspensão. As patas traseiras ficam sem contato com a base ou com as laterais da gaiola.

No assoalho da gaiola foi colocada serragem para higienização e também a ração do animal que foram trocadas diariamente. O fornecimento de água ao animal, como descrito anteriormente, foi feito com a fixação de uma garrafa na parede lateral

(FIG. 16). Durante a movimentação dos animais, acontecia um deslizamento da presilha que permaneceu conectada à cauda e fixada na haste de aço. Os animais puderam, então, movimentar-se em um ângulo de 360° com livre acesso à água e à ração e sem apoiar-se nas paredes laterais.

FIGURA 16 – Ilustração do posicionamento do animal e o acesso à (A) água e (B) ração.

2.3 Ensaio mecânico

2.3.1 *Preparo para o ensaio mecânico*

Para a coleta do material, os ratos foram sacrificados com inalação excessiva de éter sulfúrico. Depois, os membros posteriores foram dissecados e as unidades tíbio-fibulares direita e esquerda retiradas e limpas das partes moles circundantes. Os ossos tíbia e fíbula permaneceram conectados. Portanto, o perióstio e a cartilagem articular nas extremidades foram preservados e a dissecação dos músculos foi realizada com cuidado para evitar danos a essas estruturas (FIG. 17).

FIGURA 17 – Par de ossos obtidos para o ensaio mecânico mostrando a tíbia e fíbula limpas de partes moles adjacentes.

Após a dissecação, os ossos foram identificados, envolvidos em gaze umedecida em soro fisiológico e estocados em “freezer” à temperatura aproximada de -20° C.

2.3.2 Ensaio de flexão em três pontos

Para os ensaios mecânicos foi utilizada a máquina universal de ensaio do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vinte e quatro horas antes do ensaio os ossos foram retirados do “freezer” e mantidos em um refrigerador comum. Algumas horas antes de serem testados, eles foram retirados e mantidos em temperatura ambiente, para entrar em equilíbrio térmico, ainda envolvidos com gases umedecidas em soro fisiológico.

O conjunto tíbia-fíbula de cada lado foi submetido à flexão simples com três pontos de apoio. O ponto de aplicação da carga foi na face posterior da tíbia, sendo que a face anterior permanecia voltada para baixo e a distância entre os pontos de apoio foi de 2,5cm. Foi aplicada pré-carga de 200 g., com tempo de acomodação de 1 minuto, na direção vertical, de cima para baixo (FIG. 18).

FIGURA 18 – Detalhe do posicionamento do conjunto tíbia-fíbula para a realização do ensaio de flexão. A força é aplicada na tíbia.

A carga foi aplicada a uma velocidade de 0,25mm/min e registrada por uma célula de carga de 200 kgf (Kratos[®]) acoplada ao amplificador CAE 201 Sodemex[®]. Sendo que a fíbula não foi submetida diretamente à carga. As deformações foram obtidas por um relógio comparador com precisão de 0,01 mm e as medidas realizadas a cada 0,02mm. Todos os ensaios foram realizados em condições semelhantes e, durante todos eles, os ossos foram mantidos umedecidos em soro fisiológico para evitar o ressecamento.

2.3.3 *Análise dos parâmetros mecânicos*

Para cada ensaio foi construído o gráfico carga $\times$ deflexão e obtidos os seguintes parâmetros mecânicos: limite elástico, limite máximo, rigidez e a energia absorvida pelo osso na fase elástica (resiliência).

2.3.4 *Análise estatística*

Pesos dos animais

O peso dos animais dos grupos 2,3, e 4, individualmente, foi analisado antes e depois da suspensão, utilizando o teste *t de Student pareado*.

A comparação estatística dos pesos dos animais antes da suspensão foi realizada, aplicando o teste de ANOVA para comparação simultânea entre os grupos e o método de *Student-Newman-Keuls* para comparação entre os pares de grupos. Os mesmos testes foram aplicados na comparação entre os grupos 2,3 e 4 após a suspensão.

Pesos das peças

A comparação estatística dos pesos das peças foi realizada, aplicando o teste de ANOVA para comparação simultânea entre os grupos e o método de *Student-Newman-Keuls* para comparação entre os pares de grupos.

Propriedades mecânicas

Para a análise estatística da carga e deflexão do limite elástico, deflexão do limite máximo e resiliência foi utilizado o teste ANOVA para comparação simultânea entre os grupos e, o método de *Student-Newman-Keuls* para comparação entre os pares de grupos.

A carga do limite máximo e rigidez apresentaram uma distribuição não paramétrica, portanto, foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis* para a comparação simultânea entre os grupos e o método de *Dunn* para comparação entre os pares de grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

3 RESULTADOS

Foram colocados em suspensão 45 animais, sendo que, durante a fase experimental, dois morreram. Desses, um pertencia ao grupo 2 e outro ao grupo 3. Nos primeiros animais colocados em suspensão, a extremidade da cauda não foi amputada o que resultou em necrose, devido à compressão excessiva causada pelo sistema de fixação do animal ligado ao eixo de suspensão. Portanto, a morte desses animais pode estar relacionada com a necrose da cauda. Depois, todos os animais tiveram a extremidade da cauda amputada.

Portanto, foram ensaiados os ossos tíbia e fíbula direita e esquerda de 43 animais submetidos à suspensão, somando 86 testes. Foram também analisados 10 animais do grupo controle, sendo que nesses foram ensaiados apenas o lado direito.

Para obtenção dos resultados finais, foram descartados os gráficos que apresentaram comportamentos atípicos, a maioria por problemas técnicos. Sendo assim, num total de 96 ensaios, foram aproveitados 87 para análise final.

Todos os animais foram pesados antes e após o período de suspensão.

A TAB. 1 apresenta os valores médios do peso dos animais antes e após o período de suspensão.

TABELA 1 – Valores médios do peso dos animais.

PESO DOS ANIMAIS				
<i>Período de Suspensão</i>	<i>Controle</i>	<i>7 dias</i>	<i>14 dias</i>	<i>21 dias</i>
<i>N. de animais</i>	10	14	14	15
<i>Média –Peso corporal inicial (g)</i>	257,3	245,1	246,8	260,4
<i>Média –Peso corporal final (g)</i>	-	234,3	241,1	256,1

Os valores médios do peso das peças obtidos para os ensaios, podem ser vistos na TAB. 2.

TABELA 2 – Valores médios do peso das peças.

PESO DAS PEÇAS				
<i>Período de Suspensão</i>	<i>Controle</i>	<i>7 dias</i>	<i>14 dias</i>	<i>21 dias</i>
<i>N. de animais</i>	10	14	14	15
<i>Média –Peso das peças (g)</i>	0,86	0,77	0,79	0,76
<i>Desvio Padrão (g)</i>	0,05	0,07	0,06	0,07

A partir dos gráficos carga $\times$ deflexão, foram obtidos os valores das propriedades mecânicas dos ensaios de flexão em três pontos dos ossos tíbia e fíbula do grupo controle e de ratas submetidas aos diferentes períodos de suspensão (7, 14 e 21 dias) (TAB. 3).

TABELA 3 – Valores das médias e desvios padrão das propriedades mecânicas das peças dos animais dos grupos experimentais.

<i>Grupos</i>		<i>Limite Elástico</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Rigidez</i>	<i>Resiliência</i>
		<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>	<i>($\times 10^3$ N/m)</i>	<i>(J)</i>
<i>1</i>	<i>Média</i>	46,745	0,478	60,01	0,697	102,99	0,0104
	<i>D. P.</i>	5,00	0,046	7,84	0,071	17,882	0,0011
<i>2</i>	<i>Média</i>	41,394	0,484	51,291	0,729	87,357	0,0093
	<i>D. P.</i>	5,591	0,075	4,376	0,088	12,041	0,0022
<i>3</i>	<i>Média</i>	37,578	0,457	51,050	0,710	82,889	0,0080
	<i>D. P.</i>	7,258	0,099	8,789	0,075	19,789	0,0027
<i>4</i>	<i>Média</i>	32,165	0,455	43,768	0,765	71,176	0,0064
	<i>D. P.</i>	5,276	0,094	4,492	0,114	11,470	0,0033

3.1 Peso dos animais

Analisando os valores do peso dos animais, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos no início do experimento ($p=0,054$). A média de peso nos animais do grupo 1 (controle) foi de 257,3 gramas, no grupo 2 foi 245,1 gramas, no grupo 3 foi de 246,8 gramas e no grupo 4 foi 260,4 gramas.

No final do experimento o grupo 2 (7 dias de suspensão) apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo 4 (21 dias de suspensão). Porém entre os grupos 2 e grupo 3 não houve diferença estatística, assim como entre os grupos 3 e 4. Após a suspensão, a média de peso nos animais do grupo 2 foi de 234,3 gramas no grupo 3 foi 241,1 gramas e no grupo 4 foi 256,0 gramas

O peso dos animais em cada grupo foi também analisado, antes e após o período de suspensão. O grupo 2 apresentou diferença significativa ($p=0,006$), no grupo 3 não houve diferença significativa ($p=0,0061$) e no grupo 4 observou-se que houve diferença estatística significativa ($p=0,024$) (FIG. 19).

FIGURA 19 – Peso dos animais: média do peso inicial e final de todos os grupos antes e após suspensão.

Analisando os valores do peso das peças (tíbia-fíbula), observamos que houve diferença entre os grupos ($p=0,0140$). O grupo 1 (controle) apresentou diferença quando comparado a todos os outros grupos: Grupo 1 e Grupo 2 ($p=0,035$), Grupo 1 e Grupo 3 ($p=0,020$) e Grupo 1 e Grupo 4 ($p=0,0015$). Quando comparamos os grupos 2, 3 e 4 não observamos diferença: Grupo 2 e 3 ($p=0,332$), Grupo 2 e 4 ($p=0,948$) e Grupo 3 e 4 ($p=0,275$) (FIG. 20).

FIGURA 20 – Média do peso das peças (tíbia-fíbula) dos animais de todos os grupos.

3.2 Carga no limite elástico

O valor médio da carga no limite elástico (LE) obtido nos ensaios dos ossos tibia e fíbula das ratas do grupo 1 (controle) foi de $(46,75 \pm 5,00)$ N, para o grupo 2 foi $(41,39 \pm 5,59)$ N, para o grupo 3 foi $(37,58 \pm 7,25)$ N e para o grupo 4 foi $(32,17 \pm 5,27)$ N.

A comparação simultânea entre todos os grupos foi estatisticamente diferente ($p=0,009$).

Após análise dos valores da carga no LE foi verificado que houve diferença significativa entre o grupo 1 (controle) e o grupo 2 ($p=0,0064$), entre o grupo 1 (controle) e o grupo 3 ($p=0,0085$) e entre o grupo 1 (controle) e o grupo 4 ($p=0,0096$). Pudemos observar, também, diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 3 ($p=0,029$), entre os grupos 2 e 4 ($p<0,0011$) e entre os grupos 3 e 4 ($p=0,002$) (FIG. 21).

FIGURA 21 – Comparação entre os valores médios das cargas no limite elástico nos diferentes grupos

3.3 Deflexão no limite elástico

As deflexões no LE no grupo 1 (controle) apresentaram valores médios de $(0,478 \pm 0,046) \times 10^{-3} \text{m}$, para o grupo 2 $(0,484 \pm 0,075) \times 10^{-3} \text{m}$, para o grupo 3 $(0,457 \pm 0,099) \times 10^{-3} \text{m}$, e, para o grupo 4 $(0,455 \pm 0,094) \times 10^{-3} \text{m}$.

A comparação simultânea entre todos os grupos não foi estatisticamente diferente ($p=0,580$).

Comparando os valores das deflexões no LE, foi verificado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores obtidos foram: entre o grupo 1 e o grupo 2 ($p=0,816$), entre o grupo 1 e o grupo 3 ($p=0,529$) e entre o grupo 1 e o grupo 4 ($p=0,464$), entre os grupos 2 e 3 ($p=0,291$), 2 e 4 ($p=0,485$), entre os grupos 3 e 4 ($p=0,928$) (FIG. 22).

FIGURA 22 – Comparação entre os valores médios das deflexões no limite elástico nos diferentes grupos

3.4 Carga no limite máximo

O valor médio da carga no limite máximo (LM) no grupo 1 (controle) foi $(60,01 \pm 7,84)$, para o grupo 2 foi $(51,29 \pm 4,37)$ N, para o grupo 3 foi $(51,05 \pm 8,78)$ N e para o grupo 4 foi $(43,77 \pm 4,49)$ N.

A comparação simultânea entre todos os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,001$).

Pôde-se constatar que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e o grupo 2 ($p < 0,001$), entre o grupo 1 e o grupo 3 ($p = 0,008$) e entre o grupo 1 e o grupo 4 ($p < 0,001$). Podemos observar que também houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 4 e entre os grupos 3 e 4, porém não houve diferença entre o grupo 2 em relação ao grupo 3 (FIG. 23).

FIGURA 23 – Comparação entre os valores médios das cargas no limite máximo nos diferentes grupos

3.5 Deflexão no limite máximo

As deflexões no LM dos ensaios das ratas do grupo 1 (controle) apresentaram valor médio de $(0,697 \pm 0,071) \times 10^{-3} \text{ m}$, para o grupo 2 foi $(0,729 \pm 0,088) \times 10^{-3} \text{ m}$, para o grupo 3 $(0,711 \pm 0,075) \times 10^{-3} \text{ m}$ e para o grupo 4 $(0,765 \pm 0,114) \times 10^{-3} \text{ m}$.

A comparação simultânea entre todos os grupos não foi estatisticamente diferente ($p=0,105$).

Os valores das deflexões no LM foram comparados e constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O valor obtido entre o grupo 1 e o grupo 2 foi ($p=0,306$), entre o grupo 1 e o grupo 3 foi ($p=0,615$) e entre o grupo 1 e o grupo 4 ($p=0,086$). Não houve diferença estatística entre os grupos 2 e 3 ($p=0,481$), entre os grupos 2 e 4 ($p=0,176$), e entre os grupos 3 e 4 ($p=0,098$) (FIG. 24).

FIGURA 24 – Comparação entre os valores médios das deflexões no limite máximo nos diferentes grupos.

3.6 Rigidez

O valor médio da rigidez nos ensaios do grupo 1 (controle) foi $(102,99 \pm 17,88) \times 10^3 \text{ N/m}$, para o grupo 2 foi $(87,36 \pm 12,04) \times 10^3 \text{ N/m}$, para o grupo 3 $(82,89 \pm 19,78) \times 10^3 \text{ N/m}$ e, para o grupo 4, foi $(71,18 \pm 11,47) \times 10^3 \text{ N/m}$.

A comparação simultânea entre todos os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,001$).

Comparando os valores da rigidez foi verificado que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e o grupo 2 ($p = 0,004$), entre o grupo 1 e o grupo 3 ($p = 0,008$) e entre o grupo 1 e o grupo 4 ($p < 0,001$). Houve diferença estatística entre os grupos 2 e 4, porém não houve diferença entre os grupos 2 e 3; e o grupo 3 em relação ao grupo 4 (FIG. 25).

FIGURA 25 – Comparação entre os valores médios da rigidez nos diferentes grupos.

3.7 Resiliência

O valor da resiliência calculada nos ensaios do grupo 1 (controle) apresentou valor médio de $(1,041 \pm 0,116) \times 10^{-2} \text{J}$, para o grupo 2 $(0,933 \pm 0,229) \times 10^{-2} \text{J}$, para o grupo 3 $(0,803 \pm 0,270) \times 10^{-2} \text{J}$ e para o grupo 4 $(0,648 \pm 0,335) \times 10^{-2} \text{J}$.

A comparação simultânea entre todos os grupos foi estatisticamente diferente ($p=0,002$).

Não houve diferença estatística entre o grupo 1 e o grupo 2 ($p=0,168$). Porém, houve diferença entre o grupo 1 e o grupo 3 ($p=0,011$) e entre o grupo 1 e o grupo 4 ($p=0,001$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 4, porém não houve diferença entre os grupos 2 e 3 e os grupos 3 e 4. Os valores obtidos entre os grupos 2 e 3 foram ($p=0,105$), entre os grupos 2 e 4 ($p=0,002$), e entre os grupos 3 e 4 ($p=0,052$) (FIG. 26).

FIGURA 26 – Comparação entre os valores médios da resiliência nos diferentes grupos.

4 DISCUSSÃO

As pesquisas relacionadas com permanência dos astronautas no espaço mostram que realmente ocorre uma série de alterações músculo-esqueléticas, mesmo após o retorno à Terra. Essas pesquisas podem ser úteis para determinar medidas de prevenção ou tratamento da osteopenia, não somente para astronautas, mas também para pacientes com osteoporose ou ainda pacientes que necessitam permanecer acamados por longos períodos (STEHLER, 1998; COWIN, 1998).

Segundo HOLICK (1988) a permanência em ambientes de microgravidade pode levar a perda de 1% a 5% da massa óssea.

Uma vez que os animais se esforçam para sobreviver em seu ambiente natural, dependendo de adaptações às exigências apresentadas em seu “habitat”, algumas de natureza mecânica, fica claro que as adaptações morfológicas resultantes das exigências de origem mecânica sobre o animal estabelecem os parâmetros para uma interpretação mecânica de sua estrutura. Torna-se evidente que muitas perturbações e afecções traumáticas, e sua terapia no sistema locomotor, têm base mecânica. Portanto, o conhecimento básico de processo mecânico e resposta biológica no animal é de grande importância, já que uma abordagem semelhante pode ser aplicada ao ser humano (GETTY, 1980).

A maior importância desta pesquisa está relacionada à necessidade da compreensão e manipulação das forças que agem sobre o corpo humano e que influenciam o movimento (gravidade, tônus muscular, resistência externa, atrito), com intuito de identificar fatores de risco, estabelecer medidas preventivas e instituir

medidas terapêuticas de reabilitação adequadas ao enfraquecimento ósseo provocado pela inatividade.

Vários estudos foram realizados com o intuito de comprovar a efetividade dos modelos de suspensão. MARTIN (1988) fez comparação entre os dados obtidos em animais que permaneceram no espaço e animais que permaneceram em suspensão. As semelhanças encontradas nos testes sugerem que o modelo de suspensão é válido, principalmente para análise de alterações músculo-esqueléticas. Os modelos considerados ideais são aqueles que permitem livre movimentação das patas traseiras sem apoio na base ou nas paredes laterais da gaiola (DESPLANCHES, 1987; MOREY-HOTTON & GLOBUS, 1998; KASPER, 1993).

Antes da execução deste trabalho foi realizado um estudo piloto prévio. O modelo de suspensão foi elaborado a partir do citado por KASPER (1993) sendo que foram feitos os ajustes necessários na gaiola e no sistema de suspensão para garantir um ótimo funcionamento em relação ao modelo proposto. Um exemplo foi a haste utilizada no eixo de suspensão. Em nosso estudo piloto, ela era lisa, o que dificultava a coordenação dos movimentos dos animais, uma vez que eles deslizavam involuntariamente até mesmo quando estavam dormindo. Essa haste foi então substituída por uma rosqueada, o que permitiu maior estabilidade do animal durante sua movimentação e ainda facilitou a colocação do eixo de suspensão. O tamanho da gaiola foi elaborado de tal forma a impedir os animais de se apoiarem em qualquer parte da gaiola. O sistema de suspensão pela cauda foi desenvolvido minuciosamente para evitar que ocorresse qualquer tipo de lesão na cauda do animal.

No levantamento bibliográfico, foi observado um número muito pequeno de trabalhos que realizaram ensaios mecânicos em animais que permaneceram em ambientes de simulação de microgravidade.

O objetivo deste trabalho surgiu do interesse em analisar as alterações ósseas, ocorridas durante períodos de permanência em ambientes de microgravidade, ou de restrição da atividade física, por meio do ensaio de flexão em três pontos. Esse ensaio foi escolhido por se mostrar eficiente nas análises propostas e também por ser um ensaio simples e de fácil realização.

TORZILLI et al. (1982) e PESSAN (1996) analisaram as propriedades mecânicas de osso de ratos imaturos e ratos adultos jovens, com ensaio de flexão em três pontos e observaram que com o aumento da idade os ossos ficaram mais rígidos e, portanto, com maior resistência aos esforços de flexão, indicando que existe uma forte relação entre a resposta mecânica e o desenvolvimento do osso.

Os animais selecionados para esse trabalho foram adulto-jovens, pois apresentam um tamanho razoável de tíbia e fíbula o que facilita a manipulação e fixação das amostras, para melhor visualização dos eventos ocorridos durante o ensaio mecânico.

DESPLANCHES (1987) e MOREY-HOTTON et al. (2000) utilizaram ratos para o estudo de alterações provocadas no sistema músculo-esquelético no espaço estratosférico, pois esse é o animal mais utilizado para esse tipo de pesquisa, por ser resistente, de fácil obtenção e manipulação e ainda adaptável a vários protocolos experimentais.

Por esse mesmo motivo, escolhemos como animal o rato, pela facilidade de mantê-lo em laboratório, pelo baixo custo e por apresentar crescimento bastante

regular (FONTOURA FILHO, 1995). O peso médio de cada animal foi de 250 gramas. Esse tamanho foi considerado adequado para o tamanho da gaiola e para o sistema de suspensão elaborado neste trabalho.

Nos resultados de DESPLANCHES (1987) os animais tiveram maior perda de peso nos primeiros dias de suspensão, mas após quatorze dias, a maioria deles recuperou o peso perdido.

Em nosso trabalho, a análise da variação do peso dos animais entre os grupos e, em diferentes períodos inter-grupos, mostrou que, no início, há perda significativa do peso o que é natural e esperado em função da condição estressante a que o animal é submetido. Entretanto, depois, ocorre recuperação parcial mostrada pelo incremento significativo de peso no grupo 4 quando se analisa o peso médio do início e final do experimento, nesse grupo. Isto também fica patente quando se compara o incremento existente entre o peso médio final dos grupos 2 e 3.

A análise do peso no grupo 3 (14 dias) mostra que esse período é transicional.

Em resumo, quanto à análise do peso, nossos resultados mostraram que o animal, inicialmente, ressenete-se bastante da nova condição que lhe é imposta mas que, depois, sofre adaptação, recuperando-se quase que totalmente ao final de 21 dias. Esse mesmo resultado foi observado por MOREY-HOTTON (1998) que relata uma manutenção de peso dos animais após a adaptação à suspensão.

A pergunta que se faz a seguir é se seria conveniente manter esses animais em suspensão por períodos mais prolongados com a finalidade de verificar se haveria restabelecimento completo do peso. Com essa medida, provavelmente, haveria complicações relacionadas principalmente com o próprio sistema de fixação da

cauda que teria que ser refeito e, talvez, outras complicações, por exemplo respiratórias.

As médias do peso das peças (tíbia e fíbula) obtidas para o ensaio foram analisadas e o grupo 1 (controle) apresentou diferença estatística em relação aos outros grupos, o que se explica pela provável hipotrofia óssea sofrida com a imobilização.

O estudo das propriedades mecânicas do osso como uma estrutura intacta é interessante uma vez que os resultados refletem melhor a capacidade do sistema músculo-esquelético “*in vivo*”, sua função como alavanca e a capacidade para resistência aos esforços em várias condições (HAYSES & CARTER, 1971). Sendo assim, foram utilizados para análises, neste trabalho, os ossos tíbia e fíbula intactos. Esses ossos foram mantidos conectados apesar de que a presença da fíbula parece estar mais relacionada à função de inserções musculares do que ao fortalecimento do conjunto tíbio-fibular (CAZON, 1999).

HOYER & LIPPERT (1982) determinaram propriedades mecânicas do fêmur, tíbia e úmero, de animais testados em flexão, sendo que alguns foram congelados em temperatura de -20°C e outros permaneceram frescos, e observaram que não houve diferença nas propriedades mecânicas entre ossos frescos e ossos congelados. Sendo assim, após o sacrifício dos animais, neste trabalho, os ossos foram armazenados em solução fisiológica e estocados em “freezer”, pressupondo a não interferência desse processo no desempenho mecânico do osso.

Analisando em conjunto as propriedades mecânicas, verifica-se que, exceto pela deflexão no limite elástico e no limite máximo, houve diminuição de todas elas do primeiro para o quarto grupo, o que indica diminuição global da resistência óssea

aos esforços aplicados, mostrando a efetividade do sistema de suspensão em provocar o enfraquecimento do osso, que foi mais acentuada no período mais longo. Ou seja, os animais saíram do sistema com o osso enfraquecido o que é muito importante em termos do que fazer a seguir, no caso de se considerar seres humanos a serem submetidos a um processo de reabilitação em decorrência da exposição a uma condição de microgravidade real ou em função de acamamento prolongado ou em grandes imobilizações. Nesse sentido, esses dados fornecem subsídios para, em condições experimentais, serem testados vários programas ou técnicas de reabilitação que devem, sempre, otimizar o binômio “menor tempo e menor risco”. Assim, outros trabalhos poderão ser desenvolvidos a partir desta experiência, inclusive com o ensaio de drogas que possam atuar no metabolismo ósseo.

Fazendo um detalhamento dos dados obtidos com o ensaio mecânico, nota-se que a alteração mais precoce surgida foi da carga no limite de elasticidade, enquanto que as outras foram tardias e melhor caracterizadas aos 21 dias, sendo que o grupo de 14 dias realmente representou uma fase de transição, da mesma maneira que o peso corporal e, portanto, não se presta para análise definitiva. Como a deflexão não foi alterada também aos 21 dias, pode-se sugerir que um tempo maior de suspensão seria mais adequado para modificá-la. Usando o mesmo raciocínio empregado para o peso, para otimizar esse período haveria necessidade de testar outros tempos mas, talvez, um fator limitante seja a tolerância do animal.

Entretanto, em termos práticos, 21 dias parecem ser um bom período de experimentação, pois ao fim deste tempo, importantes propriedades como carga máxima e rigidez estão significativamente alteradas e estas propriedades expressam com rigor o enfraquecimento do osso e maior risco de fraturas sendo, *grosso modo*,

equivalente ao já encontrado por outros, em outras circunstâncias (GALANTE, 1970; EVANS, 1969; CARTER & HAYES, 1977; MARTIN, 1994).

A relação minuciosa entre o tipo de propriedade mecânica e microestrutura do osso ainda está por ser determinada, mas depende globalmente do tipo/ quantidade de colágeno e da parte mineral, principalmente o cálcio. Assim, fica difícil explicar em termos de microestrutura o que acontece ao osso com a suspensão a ponto de enfraquecê-lo significativamente mas não interferir em sua capacidade de deflexão. Cremos que esse assunto deva ser motivo de investigação.

Na literatura MOREY-HOTON & GLOBUS (1998) referem que ambientes de microgravidade ou que a simulem promovem tanto diminuição na formação quanto na reabsorção do osso. Esses mecanismos atuam diretamente na quantidade de colágeno. Outro fator que pode estar interferindo na resistência óssea é a própria distribuição espacial do colágeno e formação das lamelas ósseas que, de acordo com a Lei de Wolff, depende das solicitações mecânicas. Resta saber se 21 dias são suficientes para que estas modificações sejam percebidas.

Outro fator que certamente está atuando é o grau de calcificação do osso que diminui em função da diminuição da pressão longitudinal (ASTRAND & RODAHL, 1980) e que pode ser monitorada em função da maior excreção de cálcio que ocorre durante a inatividade. Essa excreção pode ser aumentada em função da diminuição da massa óssea e também da menor impregnação do colágeno. Esse é outro assunto que merece investigação. Segundo HOLICK (1998) o conteúdo mineral dos ossos pode ser recuperado uma vez que acamados e astronautas sejam submetidos à atividade física regular e com intensidade moderada.

PROPOSTAS PARA NOVAS PESQUISAS

- 1- Testar tempos mais longos de exposição à suspensão.
- 2- Caracterizar melhor, do ponto de vista metabólico as alterações encontradas, por exemplo, no metabolismo do cálcio e fósforo.
- 3- Estudar modificações na microestrutura do osso após a suspensão.
- 4- Testar diferentes métodos de reabilitação, usando o modelo aqui estudado.
- 5- Testar a influência de substâncias que atuam positivamente na neoformação óssea como os disfosfanados.

5 CONCLUSÃO

O modelo de suspensão elaborado neste trabalho mostrou ser eficaz, simples e com boa tolerância dos animais.

A simulação de microgravidade promoveu reduções significativas nos valores da maioria das propriedades mecânicas no osso, levando ao seu enfraquecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, A.C.; KELLER, T.S.; SPENGLER, D.M. The effects of simulated weightlessness on bone and biochemical properties in the maturing rat. **J.Biomech.**, New York, v.21, p. 755-767, 1988.

APPELL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. A review. **Sports Med**, v. 10, n.1 , p. 42-48, 1990.

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

BALDWIN, K.M. Effect of spaceflight on the functional, biochemical and metabolic properties of skeletal muscle. **Medicine and science in sports and exercise**, Madson, p. 983-987, Dec., 1995.

BURGER, E.H.; KLEIN-NUDELEND, J. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. **Bone**, New York, v. 22, n.5, p. 127-130, 1998.

CARMELET, G.; NYS, G.; STOCKMANS, I.; BOUILLON, R. Gene expression related to the differentiation osteoblastic cells is altered by microgravity. **Bone**, New York, v. 22, n. 5, p. 139-143, 1998.

CARTER, D.R.; HAYES, W. The compressive behaviour of bone as a two phase porous structure. **J Bone Jt Surg**, Boston, n. 59, p. 954-962, 1977.

CARTER, D.R.; SPLENGER, D.M. Mechanical properties and composition of cortical bone. **Clin Orthop**, Philadelphia, n. 135, p. 192-262, 1978.

CARVALHO, F.E.; PAPALÉU, N.M. **Geriatría fundamentos, clínica e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 2000.

CAZON, R.A. **Ensaio mecânico de compressão axial e flexão em três pontos em complexo tíbio-fibular de ratos adultos jovens**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. F.M.R.P., 1999.

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

CORNWALL, M. Biomechanics of noncontractile tissue. A review. **Phys Ter**, London, n. 63, p. 1869-1873, 1984.

COWIN, S.C. On Mechanosensation in bone under microgravity. **Bone**, New York, v. 22, n. 5, p. 119-125, 1998.

CURREY, J.D. The effect os porosity and mineral content on the Young's modulus of elasticity of compact bone. **J Biomech**, New York, v. 21, p. 131-139, 1988.

DESPLANCHES, D.; MAYET, M.H.; SEMPORE, B.; FLANDROIS, R. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. **J.Appl.Pysiol.**, Washington, v. 63, p. 558-563, 1987.

EINHORN, T.A. Mechanical properties of bone. In: Principles of bone biology, BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, A.G. **Academic Press**, New York, p. 27-37, 1996.

EVANS, F.G.; VINCENELLI, R. Relation of collagen fiber orientation to some mechanical properties of human cortical bone. **J Biomech**, New York, n. 8, p. 81-86, 1969.

FITTS, R.H.; METZGER, J.M.; RILEY, D.A.; UNSWORTH, B.R. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. **J Appl Physiol**, Washington, v. 60, n. 3, p. 1946-1953, 1986.

FONTOURA FILHO, C. **Ensaio de cisalhamento na placa de crescimento proximal da tíbia de ratas em idades diferentes**. Ribeirão Preto, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1995.

FRACCAROLI, J.L. **Biomecânica: análise dos movimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1981.

FUNG, Y.C. **Bone and cartilage**. In: Mechanical properties of living tissues. Springer-Verlag, New York, p. 383-415, 1981.

GALANTE, J.; ROSTOKER, W.; RAY, R.D. Physical properties of trabecular bone. **Calc Tiss Res**, Berlin, n. 5, p. 236-246, 1970.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Interamericana, 5. ed., p. 47, 1980.

GOULD III, J.A. **Biomecânica básica na terapia esportiva e ortopédica**. In: Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte. São Paulo: Manole, p. 3-83, 1993.

GUIGNANDON, A.; USSON, Y.; LAROCHE, N.; LAFAGE-PROUST, M.H.; SABIDO, O.; ALEXANDRE, C.; VICO, L. Effects of intermittent or continuous gravitational stresses on cell-matrix adhesion: Quantitative analysis of focal contacts in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. **Experimental Cell Research**, New York, n. 236, p. 66-75, 1997.

HALL, S.J. **Biomecânica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 64-65, 1991.

HART, K.; SHAW, J.; VAJDA, E.; HEGSTED, M.; MILLER, S. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength and dynamics. **J Appl Physiol**, Washington, v. 91, p. 1663-1668, (2001).

HAYSES, W.C.; CARTER, D.R. Biomechanics of bone. In. Skeletal Research, SIMMONS, D.J.; KUNIN, AS. **Academic Press**, New York, n. 1, p. 231-235, 1971.

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

HOYER, H.E.; LIPPERT, H. Biomechanics changes in long limb bones of Han-Wistar rats during postnatal development. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 164, p. 101-111, 1982.

JASPERS, S.R., Tischeler, M.E. Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail- cast suspension. **J Appl Physio.: Respiratory Environmental and Exercise Physiology.**, Washington, v. 57, p. 1472-1479, 1984.

JOHNSON, R.B. The bearable lightness of being: Bones, muscle, and spaceflight. **New Anat.**, p. 24-27, 1998.

JUNQUEIRA, L.C., Carneiro, J. **Histologia básica**. 9. ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 1999.

KASPER, C.E.; McNULTTY, A.L.; OTTO, A.J.; THOMAS, D.P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: An empirical model. **Research in nursing & health**, New York, v. 16, p. 265-273, 1993.

KASPER, C.E.; WHITE, T.P.; MAXWELL, L.C. Running during recovery from hindlimb suspension induces muscular injury. **J. Appl Physiol.**, Washington, v. 68, p. 533-539, 1990.

LEBLANC, A.; SHACKELFORD, L.; SCHNEIDER, V. Future human bone research in space. **Bone**, New York, v. 22, p. 113-116, 1998.

MARTIN, R.B.; BOARDMAN, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. **J. Biomech.**, New York, n. 26, p. 1047-1054, 1994.

MARTIN, T.P.; EDGERTON, V.R.; GRINDELAND, R.E. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, Washington, v. 65, p. 2318-2325, 1988.

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

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**, Washington, n. 91, p. 2334-2341, 2001.

MC ALISTER, G.B.; MOYLE, D.D. Some mechanical properties of goose femoral cortical bone. **J Biomech**, New York, n. 16, p. 577-589, 1983.

MIYAMOTO, A.; SHIGEMATSU, T.; FUKUNAGA, T.; KAWAKAMI, K.; MUKAI, C.; SEKIGUCHI, C. Medical baseline data collection on bone and muscle change with space flight. **Bone**, New York, v. 22, n. 5, p. 79-82, 1998.

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

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

MOREY-HOLTON, E.R.; HALLORAN, B.P.; GARETTO, L.P.; DOTY, S.B. Animal housing influences the response of bone to spaceflight in juvenile rats. **J Appl Physiol**, Washington, n. 88, p. 1303-1309, 2000.

MUSACHIA, X.J.; DEEVERS, D.R.; MEININGER, G.A.; DAVIS, T.P. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. **J. Appl. Physiol.**, Washington, v. 48, p. 479-486, 1980.

MUSACCHIA, X.J.; STEFFEN, J.M.; DEEVERS, D.R. Rat hindlimb muscle responses to suspension hypokinesia/hipodynamia. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, Washington, v. 54, p. 1015-1020, 1983.

MUSACCHIA, X.J.; STEFFEN, J.M.; FELL, R.D. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 16, p. 61-87, 1988.

PESSAN, V.J. O. **Ensaio de flexão em três pontos nas faces anterior e posterior de fêmures de rata, em duas fases diferentes de crescimento**. Dissertação (Mestrado) – Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, F.M.R.P, 1996.

RUBIN, C.T.; LANYON, L.E. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone. **J. Orthop. Research**, New York, v. 5, p. 300-310, 1987.

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

SHIMANO, A.C. **Análise das propriedades geométricas e mecânicas de tíbia humana: proposta de metodologia**. São Carlos. Tese (Doutorado) – escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1994.

SIMKIN, A.; ROBIN, G. The mechanical testing of bone in bending. **J. Biomech**, New York, v. 6, p. 31-39, 1973.

SINGH, L. The architecture of cancellous bone. **J. Anat.**, London, v. 127, p. 305-310, 1978.

SOUZA, S.A. **Ensaaios mecânicos de materiais metálicos**. São Paulo: Edgard Blücher, Ensaio de tração, p. 3-58, 1974.

STEHLE, P. Summary of research issues in the animal model. **Bone**, New York, v. 22, p. 101-102, 1998.

TORZILLI, P.A.; TAKEBE, K.; BURSTEIN, A.H.; ZIKA, J.M.; HEIPLE, K.G. The material properties of immature bone. **J. Biomech Eng**, New York, v. 104, p. 12-20, 1982.

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

VICO, L. Summary of research issues in biomechanics and mechanical sensing. **Bone**, New York, v. 22, .5, p. 135-137, 1998.

WEST, J.B. Physiology of a microgravity environment historical perspectives: physiology in microgravity. **J. Appl Physiol.**, Washington, v. 89, p. 379-384, 2000.

WINIARSKIS, A.M.; ROT, R.R.; ALFORD, E.K.; CHIANG, P.C.; EDGERTON, V.R.. Mechanical properties of rat skeletal muscle after hindlimb suspension. **Experimental .Neurology**, New York, v. 96, p. 650-660, 1986.

ANEXOS

I - Tabelas A_1 , A_2 , A_3 , A_4 -. Valores do peso corporal de cada animal dos grupos experimentais.

II - Tabela B_1 - Valores do peso das peças de cada animal.

III – Tabelas C_1 , C_2 , C_3 , C_4 – Valores das propriedades mecânicas das peças dos animais.

TABELA A₁ - Valores do peso corporal dos animais do grupo 1 (controle).

Peso dos animais – Grupo 1 Controle	
Animal	Inicial
1	256
2	261
3	265
4	258
5	254
6	250
7	260
8	256
9	258
10	255
Média	257,3
Desv.Pad	4,13

TABELA A₂ - Valores do peso corporal dos animais do grupo 2 (inicial/final).

Peso dos animais do Grupo 2		
Animal	Inicial	Final
1	260	250
2	255	250
3	255	250
4	250	235
5	270	265
6	240	230
7	242	245
8	215	210
9	230	230
10	235	230
11	240	215
12	265	235
13	235	195
14	240	240
Média	245,1	234,3
Desv. Pad.	14,89	18,38

TABELA A₃ - Valores do peso corporal dos animais do grupo 3 (inicial/final).

<i>Peso dos animais do Grupo 3</i>		
Animal	Inicial	Final
1	282	285
2	248	245
3	260	240
4	210	225
5	245	255
6	245	240
7	240	230
8	255	250
9	235	235
10	255	235
11	245	230
12	240	225
13	255	250
14	240	230
Média	246,8	241,1
Desv. Pad.	15,83	15,83

TABELA A₄ - Valores do peso corporal dos animais do grupo 4 (inicial/final).

<i>Peso dos animais do Grupo 4</i>		
Animal	Inicial	Final
1	240	240
2	248	255
3	245	245
4	250	240
5	295	295
6	265	260
7	298	300
8	235	230
9	295	290
10	295	295
11	255	250
12	230	215
13	240	225
14	255	240
15	260	260
Média	260,4	256,1
Desv. Pad.	23,9	26,36

TABELA B₁ – Valores do peso das peças de todos os animais

<i>Animal</i>	<i>Peso das peças (g) – Tibia e fíbula</i>			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	0,92	0,648	0,828	0,832
2	0,875	0,692	0,723	0,919
3	0,826	0,798	0,728	0,757
4	0,996	0,716	0,870	0,815
5	0,822	0,703	0,738	0,689
6	0,798	0,698	0,838	0,729
7	0,877	0,681	0,891	0,690
8	0,789	0,792	0,892	0,859
9	0,874	0,788	0,888	0,703
10	0,904	0,733	0,863	0,747
11		0,814	0,832	0,752
12		0,785	0,684	0,737
13		0,728	0,777	0,842
14		0,722	0,796	0,815
15		0,730	0,928	0,738
16		0,856	0,758	0,791
17		0,666	0,789	0,645
18		0,798	0,798	0,724
19		0,782	0,750	0,789
20		0,888	0,802	0,784
21		0,890	0,761	0,890
22		0,831	0,63	0,858
23		0,783	0,784	0,791
24		0,888	0,699	0,752
25		0,866	0,816	0,727
26		0,824	0,804	0,762
27		0,857	0,801	0,887
28		0,681	0,781	0,722
29				0,728
30				0,620
Média	0,86	0,77	0,79	0,76
Desv.Pad.	0,05	0,07	0,06	0,07

TABELA C₁ – Valores das propriedades mecânicas dos ossos dos animais do grupo 1 (controle).

<i>Animais</i>	<i>Limite Elástico</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Rigidez (x10³ N/m)</i>	<i>Resiliência (J)</i>
	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão (x10⁻³ m)</i>	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão (x10⁻³ m)</i>		
1	42,982	0,434	57,10	0,545	93,943	0,0095
2	44,701	0,506	50,35	0,73	88,121	0,0110
3	42,368	0,525	52,80	0,738	90,357	0,0097
4	51,578	0,530	67,54	0,796	102,318	0,0130
5	38,377	0,540	49,00	0,729	71,563	0,0098
6	54,649	0,475	71,22	0,68	125,844	0,0113
7	51,885	0,434	69,38	0,757	128,051	0,0102
8	46,052	0,472	58,94	0,646	111,719	0,0105
9	48,815	0,463	62,32	0,699	101,001	0,0099
10	46,052	0,404	61,40	0,646	117,019	0,0088
Média	46,75	0,478	60,01	0,697	102,99	0,0104
Desv.Pad.	5,00	0,046	7,84	0,071	17,882	0,0011

TABELA C₂ - Valores das propriedades mecânicas dos ossos dos animais do grupo 2 (7 dias de suspensão).

<i>Animais</i>	<i>Limite Elástico</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Rigidez ($\times 10^3$ N/m)</i>	<i>Resiliência (J)</i>
	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>		
1	38,377	0,441	49,43	0,637	97465	0,00696
2	51,271	0,429	61,403	0,680	118368	0,01019
3	47,403	0,574	56,491	0,780	86483	0,011918
4	36,842	0,482	43,59	0,675	74330	0,00838
5	41,754	0,054	50,96	0,726	89529	0,00967
6	48	0,574	54,649	0,756	84012	0,01289
7	39,298	0,506	46,052	0,796	78262	0,00931
8	43,596	0,482	52,131	0,608	82681	0,010542
9	38,561	0,412	55,877	0,854	100477	0,00744
10	49,122	0,595	54,649	0,675	82155	0,01353
11	37,456	0,464	51,578	0,714	81683	0,00776
12	47,403	0,539	51,578	0,598	85168	0,01241
13	34,078	0,369	49,859	0,791	94862	0,00601
14	33,771	0,395	50,35	0,798	82135	0,00608
15	46,666	0,425	58,271	0,595	118743	0,00916
16	32,543	0,446	40,526	0,747	68836	0,00684
17	43,473	0,685	51,701	0,955	75590	0,01159
18	38,561	0,447	50,657	0,694	82693	0,00826
19	30,087	0,356	50,842	0,854	77615	0,00491
20	41,877	0,462	47,28	0,820	98138	0,01051
21	41,754	0,482	49,736	0,697	90139	0,00924
22	43,105	0,506	50,964	0,695	78376	0,00948
23	38,684	0,458	53,144	0,756	83731	0,0081
24	43,289	0,481	49,000	0,697	85352	0,00991
25	47,894	0,558	51,578	0,636	87122	0,01223
Média	41,394	0,484	51,291	0,729	87,357	0,0093
Desv.Pad.	5,591	0,075	4,376	0,088	12,041	0,0022

TABELA C₃ - Valores das propriedades mecânicas dos ossos dos animais do grupo 3 (14 dias de suspensão).

<i>Animais</i>	<i>Limite Elástico</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Rigidez ($\times 10^3$ N/m)</i>	<i>Resiliência ($\times 10^{-2}$ J)</i>
	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>		
1	54,035	0,000467	67,543	0,000717	109130	0,0119
2	29,473	0,000419	36,842	0,000757	65476	0,00583
3	38,807	0,000518	49,429	0,000732	74587	0,00896
4	32,543	0,000289	60,175	0,000868	106231	0,00443
5	34,078	0,000458	43,596	0,000709	75857	0,00698
6	49,122	0,000525	59,561	0,000747	93056	0,01238
7	35	0,000472	41,447	0,000636	72625	0,00785
8	46,052	0,000378	63,245	0,000656	116957	0,00835
9	30,701	0,000324	61,052	0,000752	92201	0,00451
10	31,929	0,000458	39,298	0,000636	67843	0,0068
11	26,71	0,000448	52,807	0,000875	56468	0,00566
12	29,78	0,000448	41,754	0,000636	63046	0,00632
13	37,456	0,000299	54,157	0,00055	119110	0,00532
14	35	0,000439	46,666	0,000686	75356	0,00729
15	40,526	0,000482	49,859	0,000709	81531	0,00947
16	36,842	0,000348	51,456	0,000658	100221	0,00606
17	32,543	0,000552	41,14	0,000677	53115	0,00887
18	48,508	0,000651	57,719	0,000837	72073	0,0155
19	37,456	0,000637	41,14	0,000738	70745	0,00748
20	49,736	0,000429	63,859	0,000699	116871	0,01001
21	42,061	0,000477	52,684	0,000658	95580	0,00859
22	41,447	0,000404	57,719	0,000757	99096	0,00808
23	31,929	0,000399	44,517	0,000615	76175	0,00606
24	39,298	0,000593	50,043	0,000757	69781	0,00998
25	27,938	0,000349	58,333	0,000738	75300	0,00458
26	38,07	0,000629	41,263	0,000677	56694	0,01157
Média	37,578	0,457	51,050	0,710	82,889	0,0080
Desv.Pad.	7,258	0,099	8,789	0,075	19,789	0,0027

TABELA C₄ - Valores das propriedades mecânicas dos ossos dos animais do grupo 4 (21 dias de suspensão).

<i>Animais</i>	<i>Limite Elástico</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Rigidez ($\times 10^3$ N/m)</i>	<i>Resiliência (J)</i>
	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>	<i>Carga (N)</i>	<i>Deflexão ($\times 10^{-3}$ m)</i>		
1	34,078	0,00054	40,526	0,000837	67763	0,00758
2	31,622	0,00053	46,666	0,00073	90698	0,00624
3	35	0,000624	42,368	0,000829	65447	0,00871
4	31,315	0,00053	42,982	0,000849	59669	0,00733
5	31,315	0,00054	47,894	0,000972	63479	0,0071
6	32,236	0,000354	48,508	0,000776	96124	0,0047
7	30,087	0,000451	45,438	0,000815	77172	0,00516
8	23,64	0,000307	44,824	0,000752	77835	0,00313
9	37,456	0,000516	47,587	0,000747	74041	0,00856
10	40,219	0,000492	50,043	0,000695	77378	0,00936
11	26,403	0,000313	40,219	0,000738	80432	0,00393
12	26,403	0,000366	31,622	0,000533	67107	0,00449
13	36,842	0,000412	44,21	0,00053	89743	0,00682
14	35,614	0,000453	44,21	0,000954	74551	0,00764
15	34,692	0,000506	41,14	0,000617	70155	0,00798
16	27,631	0,00039	37,456	0,000745	67700	0,00514
17	32,543	0,00053	39,605	0,000716	64896	0,00785
18	29,473	0,000508	51,578	0,000974	65767	0,00585
19	41,14	0,000636	47,587	0,000829	44445	0,01792
20	36,719	0,000413	44,824	0,000595	84000	0,00716
21	26,096	0,000477	39,789	0,000771	57426	0,00499
22	38,991	0,000537	47,28	0,000698	75650	0,000897
23	27,14	0,000352	43,596	0,000791	71519	0,00443
24	25,789	0,000323	43,596	0,000771	64141	0,000465
25	39,912	0,000363	47,28	0,000805	67500	0,01073
26	23,947	0,00037	37,149	0,000832	55962	0,00436
Média	32,165	0,455	43,768	0,765	71,176	0,0064
Desv.Pad.	5,276	0,094	4,492	0,114	11,470	0,0033