# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS


# AÇÃO DO ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADE EM OSSOS DE RATAS OSTEOPÊNICAS


**DANIELA CRISTINA LEITE DE CARVALHO**


Dissertação (Mestrado) Apresentada à Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

**Orientador: Prof. Dr. Alberto Cliquet Jr.**

São Carlos
2001

*Daniela Cristina Leite de Carvalho*

# *AÇÃO DO ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADE EM OSSOS DE RATAS OSTEOPÊNICAS*

São Carlos
2001

**Agradecimentos**

Ao professor Dr. ALBERTO CLIQUET JÚNIOR pelo incentivo e ajuda a mim dedicados.

À FAPESP (#96/12198-2) e à CAPES pelo suporte financeiro concedido.

A amiga Lorena C. Valenzuela Reyes pelo auxílio, entusiasmo e profissionalismo que foram muito importantes nas várias etapas deste trabalho.

Aos demais amigos Leandro Cintra, Adriana Santa Maria, Juracy Franca, Fransérgio Cunha, Marcela Sene, e funcionários Antônio Carlos e Janete que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao biólogo Nelson da Silva Júnior pela ajuda e disponibilidade durante a realização do trabalho.

Ao biólogo José Sampaio Zuanon pela amizade e paciência dedicada no ensino das técnicas envolvidas para o preparo histológico.

Ao José Luís, do Departamento de Engenharia Mecânica/UNICAMP pelos testes mecânicos realizados.

Ao professor Laurival de Luca Júnior, presidente da comissão do biotério - FOAR/ UNESP, pelo fornecimento de animais indispensáveis para a realização deste experimento.

Ao professor José Marcos Alves pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega Orivaldo Lopes da Silva pelas idéias e sugestões durante a realização deste trabalho.

A Dra. Lucimar.R.S. de Avó e Dr Marco de Avó pela ajuda na análise das lâminas histológicas.

Ao Gilberto Batista de Souza e sua equipe técnica da EMBRAPA Pecuária Sudeste pela disponibilidade para a realização das análises quantitativas do conteúdo mineral ósseo.

Ao colega Carlos Alberto da Silva Bento pela ajuda e colaboração nas realizações do MEV.

Ao professor Jorge Oishi pela orientação na realização de análise estatística.

Ao colega Mário Jefferson pela ajuda dada no decorrer do trabalho.

Aos colegas José Silvano Cerqueira Lima e Mário Gazziro pela ajuda dada em muitas etapas deste trabalho.

*Aos meus pais Marinho e Lúcia*

*pelo apoio e incentivo em todos os projetos de minha vida..*

*Ao meu namorado Henrique pela ajuda, paciência e compreensão durante a realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

**Índice de Figuras**.....i
Índice de Tabelas.....v
**Resumo**.....vi
Abstract.....vii
**1. Introdução** .....1
**2. Objetivos** .....3
3. Revisão Bibliográfica.....4
3.1. O Osso.....4
3.2. Biomecânica do Osso.....7
3.3. Lesão Medular.....9
3.4. Aspectos Epidemiológicos e Sócio-Econômicos da Osteoporose.....11
3.5. Osteoporose.....12
3.6. Diagnóstico.....17
3.7. Tratamento.....18
3.8. Ultra-som.....20
3.9. Modelo de Rata Madura.....23
**4. Material e Métodos** .....27
4.1 Animais .....27
4.2. Procedimento Cirúrgico Experimental.....27
4.2.1. Procedimento Utilizado em Estudo Piloto.....27
4.2.1.1. Cirurgia no Estudo Piloto.....27
4.2.2. Procedimento Cirúrgico Final.....29
4.3.Tratamento.....29
4.4. Métodos de Avaliação.....31
4.4.1. Massa Corpórea.....31
4.4.2. Ensaio Mecânico.....32
4.4.2.1. Limite Máximo.....33
4.4.2.2. Rigidez.....33
4.4.2.3. Resiliência.....33
4.4.2.4. Tenacidade.....34
4.4.3. Análise de Cálcio/Fósforo.....34

4.4.4. Microscopia de Luz Comum.....35
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....35
4.4.6. Análise Estatística.....36
5. Resultados.....37
5.1. Estudo Piloto.....37
5.1.1. Massa Corpórea.....37
5.1.2. Ensaio Mecânico.....37
5.1.3. Análise Quantitativa de Cálcio/Fósforo.....39
5.1.4. Microscopia de Luz Comum.....40
5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....42
5.2. Tratamentos.....43
5.2.1. Massa Corpórea.....43
5.2.2. Ensaio Mecânico.....44
5.2.3. Análise Quantitativa de Cálcio/Fósforo.....45
5.2.4. Microscopia de Luz Comum.....46
5.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....50
6. Discussão.....54
7. Conclusões.....60
8. Anexos.....61
8.1. Anexo 1 - Estudo Piloto.....62
8.1.1. Massa corpórea.....62
8.1.1.1. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo controle no início e final do experimento.....62
8.1.1.2. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo ovarectomizado no início e final do experimento.....62
8.1.2. Propriedades mecânicas.....63
8.1.2.1. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas controle.....63
8.1.2.2. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas ovarectomizado.....63
8.2. Anexo 2 – Estudo Experimental.....64
8.2.1. Massa corpórea.....64
8.2.1.1. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo placebo no início e final do experimento.....64

8.2.1.2. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo tratado no início e final do experimento.....64
8.2.2. Propriedades mecânicas.....65
8.2.2.1. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas placebo. .....65
8.2.2.2. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas tratadas.....66
8.2.3. Quantidades de cálcio e fósforo.....67
8.2.3.1. Tabela da quantidade mineral óssea do grupo placebo.....67
8.2.3.2. Tabela da quantidade mineral óssea do grupo tratado.....67
9. Referência s Bibliográficas.....68

**ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1. Representação esquemática de osso. A) 1- periósteo; 2- osteócitos; 3- lacunas ósseas; 4- osteoblastos. B) Osso quando submetido à força externa se deforma, e consequentemente promove o deslocamento do fluido intersticial. C) Fluxo do fluido intersticial promovendo cisalhamento em osteócitos. Estímulo para remodelamento ósseo..... ..... 9

FIGURA 2. Fatores que interferem na osteoporose ..... 14

FIGURA 3. Tricotomia realizada no baixo ventre ..... 27

FIGURA 4. A) Incisão realizada na pele, B) Incisão realizada na camada muscular..... 28

FIGURA 5. A) Região da base uterina onde foi realizada a sutura, B) Base uterina suturada..... 28

FIGURA 6. A) Sutura interna, B) Sutura externa ..... 29

FIGURA 7. Ultra-som pulsado de baixa intensidade ..... 30

FIGURA 8. Equipamento de ultra-som de baixa intensidade com o cabeçote acoplado na região inferior da mesa utilizada para imobilizar os animais..... 31

FIGURA 9. Animais colocados na mesa de suporte, com o cabeçote de ultra-som sob as regiões do colo do fêmur de ambas as patas..... 31

FIGURA 10. Desenho esquemático mostrando o osso apoiado em suas extremidades por uma distância "L" entre os dois suportes, com a aplicação de uma carga "F"..... 32

FIGURA 11. Exemplo de gráfico carga versus deflexão. LP: limite proporcional (ponto

final da região elástica); LR: limite de ruptura (limite máximo); área do triângulo O-A-LP: resiliência; tangente do ângulo O: rigidez; área total sob a curva O-LP-LR: tenacidada..... 33

FIGURA 12. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo controle..... 38

FIGURA 13. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo ovarectomizada..... 38

FIGURA 14. Comparação entre os diferentes grupos do estudo piloto para cada propriedade mecânica. Não existem diferenças estatisticamente significativas para todas as propriedades analisadas..... 38

FIGURA 15. Quantidades de cálcio e fósforo em g/kg dos grupos controle e ovarectomizado..... 39

FIGURA 16. Fotomiografias de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas ovarectomizadas, após 30 dias de cirurgia. As setas indicam células osteoblásticas em contato com trabécula óssea. Coloração HE. Corte longitudinal. A) Aumento de 160 x; B) Aumento de 320 x..... 40

FIGURA 17. Fotomiografias de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo controle. As setas indicam células osteoblásticas com menor contato com trabécula óssea, caracterizando uma menor ativação da formação óssea. Coloração HE. Corte longitudinal. A) Aumento de 160 x; B) Aumento de 320 x..... 41

FIGURA 18. Fotomiografias de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo controle. As setas pretas apontam uma região bem delimitada preenchida por hemácias, indicando ser um vaso sanguíneo. As setas amarelas mostram hemácias imaturas, ao redor do vaso sangüíneo. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 160x..... 41

FIGURA 19. A) Microscopia eletrônica de varrredura da cabeça femural de rata controle; B) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata ovarectomizada.

Elipses indicam diferenças estruturais entre os grupos. Observam-se poros mais profundos e de maiores dimensões no grupo ovarectomizado comparado com grupo controle. Aumento de 100x..... 42

FIGURA 20. A) Microscopia eletrônica de varrredura da cabeça femural de rata controle; B) Microscopia eletrônica de varrredura da cabeça femural de rata ovarectomizada. As setas apontam porosidade óssea. Observam-se poros maiores e mais profundos na região trabecular do osso de rata ovarectomizada. Aumento de 200x..... 42

FIGURA 21. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo placebo..... 44

FIGURA 22. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo tratado..... 44

FIGURA 23. Comparação entre os diferentes grupos experimentais para cada propriedade mecânica. Não existem diferenças estatisticamente significativas para todas as propriedades analisadas..... 45

FIGURA 24. Quantidades de fósforo e cálcio em g/kg. Grupo controle: ratas não ovarectomizadas e sem tratamento; Grupo tratado: ratas ovarectomizadas e submetidas ao tratamento ultra-sônico..... 46

FIGURA 25. A) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas placebo. B) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas tratado. Neste aumento não é possível observar diferenças entre os grupos. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 80x..... 47

FIGURA 26. A) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas placebo. B) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas tratado. Elipses indicam regiões com concentrações de osteoblastos. Observa-se no grupo placebo células osteoblásticas em menor quantidade e com menor interação entre elas e as trabéculas ósseas. Coloração HE. Corte longitudinal. A) Aumento de 160 x..... 48

FIGURA 27.Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de rata do grupo tratado. Setas brancas indicam: Osteoblastos; Setas amarelas indicam: Hemácias. Corte longitudinal. Coloração HE. Aumento de 320 x..... 49

FIGURA 28. A-B) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo placebo; setas indicam matriz óssea formada por osso maduro (trabéculas totalmente coradas em azul); C-D) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo tratado; as setas indicam neoformação óssea (regiões trabeculares coradas em vermelho). Corte longitudinal. Coloração TM. Aumento de 160 x..... 50

FIGURA 29. A) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata do grupo placebo; B) Foto da cabeça femural do grupo tratado. Elipses indicam a diferença estrutural entre os grupos. Pode-se observar, no grupo placebo, trabeculado ósseo mais separados. Aumento 100 x..... 51

FIGURA 30. A) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo placebo. As setas indicam maior destruição da microarquitetura óssea comparado com o grupo tratado; B) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo tratado. Aumento 200 x..... 52

FIGURA 31. Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata do grupo tratado. Detalhe da estrutura trabecular da região circundada pela elipse da Fig 28-B. Aumento de 2000 x..... 52

FIGURA 32. A) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo placebo; B) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo tratado. Setas indicam medula óssea ao redor de trabéculas ósseas. Aumento de 2000 x..... 53

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de risco para osteoporose.....13

Tabela 2. Valores médios e DP das medidas corpóreas dos dois grupos experimentais do estudo piloto.....37

Tabela 3. Propriedades mecânicas dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais (média ± DP).....39

Tabela 4. Valores médios e DP das medidas corpóreas dos dois grupos experimentais.....43

Tabela 5. Propriedades mecânicas dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais (média ± DP).....44

Tabela 6. Valores médios e DP das quantidades de cálcio e fósforo dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais.....45

**RESUMO**

Carvalho, D.C.L. (2001). Ação do Ultra-som de Baixa Intensidade em Ossos de Ratas Osteopênicas. São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Por ser a osteoporose um grande problema de saúde pública e sua ocorrência aumentar os índices de morbidade e mortalidade proporcionados por fraturas geradas pela maior fragilidade óssea é importante o estudo de novos tratamentos para este quadro clínico. Tratamentos alternativos são opções para pessoas com alto risco de desenvolver osteoporose mas que possuem restrições aos tratamentos convencionais já existentes. Assim, este estudo tem o objetivo de analisar a ação do ultra-som de baixa intensidade (30mW/cm$^2$, freqüência de repetição de 1 KHz e ciclo de trabalho de 20%), como método não invasivo, em modelo de ratas osteopênicas. O modelo experimental foi obtido através da realização de ovarectomia e histerectomia em ratas da raça Holstman, com aproximadamente 200 gramas. Para obtenção do quadro de osteopenia foram aguardados 30 dias. Os animais foram divididos dois grupos: grupo placebo e grupo tratado. O tratamento começou no 31$^{\circ}$ dia após o procedimento cirúrgico, com duração de 20 dias consecutivos por 20 minutos diários. No grupo placebo, as ratas não foram submetidas ao tratamento ultra-sônico mas foram submetidas ao mesmo estresse causado às do grupo tratado. A emissão do campo ultra-sônico, no grupo tratado, foi na região do colo de fêmur. As propriedades mecânicas da diáfise femoral não se alteraram nos ossos osteopênicos comparados com ossos normais, assim como também não se alteraram nos ossos tratados comparados com os não tratados. Os resultados quantitativos de cálcio e fósforo não mostraram diferenças significativas entre os grupos placebo e tratado. No entanto, os achados qualitativos obtidos através da microscopia eletrônica de varredura indicaram uma microarquitetura óssea mais preservada nos ossos do grupo tratado.

Palavras chaves: Ultra-som, Osteopenia, Rata, Propriedades mecânicas, Análise de cálcio e fósforo, Análise estrutural.

## ABSTRACT

Carvalho, D.C.L. (2001). The action of low Intensity Ultrasound in Bones of Osteopenic Rats. São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

As osteoporosis has become a major public health problem and its occurrence increases the rates of morbidity and mortality caused by fractures originated from bone fragility, it is important to study new treatments for this disease. Alternative treatments are options for those people with increased risk of osteoporosis development but with restrictions for the ordinary treatments already existent. This study aims at analyzing the low intensity ultrasound action ($30mW/cm^2$, 200µs burst of 1.5 MHz sine waves repeated at 1.0kHz) as a non invasive method, in the osteopenic rat model. Mature Holstman rats were subjected to bilateral ovariectomy. In order to obtain osteopenic rats, a 30 day period was allowed. The animals were separated in 2 groups: non-treated and treated. The treatment began in the 31$^{st}$ day after the surgery, lasting twenty days, 20 minutes/day, in the femural neck site. The non treated group was subjected to the same stress caused to the treated group. The bone mineral matrix content of the femural neck (calcium and phosphorus) showed no significant differences among the groups. However, the analyzes using scanning electron micrographs indicated the smaller microarchitectural deterioration of trabecular bone present in the treated rats groups.

Key words: Ultrasound, Osteopenia, Rat model, Calcium and phosphorus analyzes, Strut analysis.

# 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a osteoporose como uma "doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura" (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993).

Nos últimos tempos, a osteoporose tem aparecido como grande problema de saúde pública. O aumento dos casos de osteoporose vem ocorrendo pela ampliação da expectativa de vida, aumentando assim, doenças relacionadas com a idade avançada. No entanto, a osteoporose tem etiologia multifatorial, podendo também estar presente em lesados medulares (AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH, 1999).

Segundo dados do IBGE, o número de pessoas com risco de apresentar osteoporose iria aumentar de 7,5 milhões em 1980 para 15 milhões no ano 2000. Essa expectativa só seria modificada se os pacientes com maior risco de desenvolver a doença fossem precocemente identificados e tratados.

Segundo estatísticas mundiais, as fraturas mais freqüentes na osteoporose são as fraturas de coluna vertebral (17%), do terço proximal do fêmur (16%) e a do terço distal do rádio (11%), locais que apresentam maior concentração de osso trabecular e, com exceção do rádio, são ossos que suportam diretamente o peso do corpo (BONNICK, 1994; GROSSI et al, 1996; PLAPLER, 1997). Geralmente, as fraturas do colo e outras regiões do terço proximal do fêmur ocorrem por quedas embora possam ocorrer espontaneamente (www.merck.com/pro/osteoporosis/inde51.htm).

O índice de mortalidade em pacientes com fratura de quadril é de 17% a 33% no primeiro ano após a fratura (CHRISCHILLES et al, 1991; KANIS, 1993; JOHNELL, 1996), com maior predomínio dos óbitos, nos primeiros meses após o acidente (JOHNELL, 1996). Cerca de 20% desses pacientes não retornam ao lar, necessitando de cuidados especiais devido à perda da independência (DEVOGELAER e DEUXCHAISNES, 1993).

Portanto, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade associados, principalmente com fraturas de quadril, tratamentos para prevenir, estabilizar ou melhorar o quadro de osteoporose são importantes. No entanto, tratamentos existentes para osteoporose são predominantemente farmacológicos, os quais em alguns casos são contra-indicados ou mal tolerados por determinados pacientes. Assim, tratamentos alternativos, não invasivos, são boas escolhas na tentativa de controlar a perda de massa óssea. Atualmente, o modelo de rata ovarectomizada tem ganhado ampla aceitação para o estudo das repercussões da deficiência de hormônio ovariano sobre o sistema esquelético, bem como para analisar as respostas ósseas aos novos tratamentos.

Baseado em princípios biomecânicos, em que a carga mecânica promove deformação no osso e consequentemente gera um estímulo para uma resposta óssea local, já postulado por WOLLF em 1870, a utilização do ultra-som de baixa intensidade é uma alternativa para o estímulo de formação de osso, uma vez que o ultra-som é uma forma de energia mecânica que gera microdeformações locais nos ossos, de maneira similar às ocorridas sob força externa. Assim, a terapia com ultra-som, ao promover efeitos benéficos na estrutura óssea, deve ser utilizada para a melhora ou estabilização de quadros clínicos que apresentam problemas na manutenção da massa óssea, como nos casos de osteoporose ou em pacientes com lesão medular.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho consiste em investigar a ação do ultra-som pulsado de baixa intensidade (intensidade de 30 $mW/cm^2$, freqüência de 1,5 MHz, freqüência de repetição de 1 KHz, ciclo de trabalho de 20% e tempo de estimulação de 20 minutos diários) em ossos osteopênicos de ratas submetidas a ovarectomia e histerectomia.

# 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3.1 O Osso

O tecido ósseo tem como função principal manter o bom estado anatômico e funcional do esqueleto e a homeostase mineral apropriada.

A matriz óssea é composta em sua parte inorgânica (65%) por cálcio e fosfato, os quais formam uma estrutura cristalina, a hidroxiapatita, além de outros íons, como Na, K, Mg, $CO_3$, em diferentes proporções. Tais componentes são responsáveis pela rigidez e endurecimento do tecido ósseo, tendo caráter mais instável. A parte orgânica (35%), composta por 90% de colágeno, mucopolissacarídeos e células, é responsável pela relativa flexibilidade óssea. Todos os componentes orgânicos, quando em níveis normais, fazem do osso um bom absorvente de energia (ROBBINS, 1994).

Todos os ossos apresentam uma camada externa de osso cortical e uma massa interna de osso trabecular, exceto onde houver substituição de osso trabecular por cavidade medular ou por espaço aéreo.

As trabéculas formam uma rede que, ao se conectarem, tornam-se capazes de resistir a cargas mecânicas. Os espaços do osso trabecular contêm vasos sangüíneos, unidades especializadas de vasos sangüíneos chamadas de capilares sinusóides e rede de células hematopoiéticas, os quais juntos formam a medula óssea. O tecido hematopoiético produz células sangüíneas que quando maduras migram para o sinusóide e entram na corrente sangüínea. A vascularização é fundamental para o fornecimento de nutrientes para células ósseas, pois assim, possibilitam-nas a atuar no crescimento e reparação dos ossos (ROSS et al, 1995).

O osso cortical mantém a estrutura óssea e forma 85% do esqueleto total maduro, sendo mais abundante nos ossos longos (MUNDY, 1999). No entanto, apesar do osso trabecular só compreender 15% do esqueleto total maduro, as

mudanças neste tipo ósseo, depois dos 30 anos de idade, determinam se o paciente apresentará osteoporose (MUNDY, 1999).

O colo femural consiste de 75% de osso cortical e 25% de osso trabecular, enquanto a região intertrocantérica do fêmur consiste de 50% de osso cortical e 50% de osso trabecular (MUNDY, 1999). No entanto, segundo BOHR & SCHAADT (1985) o colo femural contém aproximadamente 40% de osso trabecular e 60% de osso cortical. O osso cortical é responsável por 50% a 70% da resistência mecânica no colo femural (HIRSCH & BRODETTI, 1956; MARTENS et al, 1983). Com a idade, existe perda de osso trabecular e um aumento na porosidade de osso cortical (PARFITT, 1984). No colo femural, a densidade mineral óssea diminui aproximadamente 58% nas mulheres e 39% nos homens durante o intervalo entre 20 e 90 anos de idade. Densidade mineral óssea na região intertrocantérica do fêmur proximal diminui, no mesmo período de tempo, 53% nas mulheres e 30% nos homens. Estas diminuições alteram a resistência mecânica do osso.

Os osteoclastos são células gigantes, móveis e multinucleadas, possuem várias mitocôndrias e vacúolos, os quais são providos de enzimas com a capacidade de digerir a matriz mineral e orgânica em meio ácido (TUREK, 1991). Os osteoblastos são células jovens muito ramificadas, originadas de células mesenquimais osteoprogenitoras, responsáveis pela formação de massa óssea, que começam a agir em cavidades deixadas pelos osteoclastos, preenchendo-as com osso recém sintetizado. Normalmente, estas células trabalham juntas, de forma equilibrada, para formar ossos fortes e saudáveis (DEMPSTER et al, 1995).

O osso não mineralizado é denominado de osteóide, enquanto osteócitos são os osteoblastos que foram envoltos por osso. Os osteócitos comunicam-se com células superficiais e com outros osteócitos, através de canalículos, permitindo a transferência de sinais e de substratos entre eles. São importantes para o controle das flutuações diárias nos níveis de cálcio e fósforo.

Quando se atinge a maturidade, a massa óssea atinge seu máximo, sofrendo o processo de remodelamento ósseo. A quantidade de massa óssea existente em um indivíduo no final de sua vida adulta está relacionada com a quantidade que ele conseguiu adquirir até a sua maturidade. Logo, a quantidade máxima que se consegue atingir de massa óssea, antes que esta comece a sua perda inexorável é o

chamado "pico de massa óssea". Quanto maior for este pico, que geralmente é atingido entre 20 e 30 anos (quando começa a decrescer), maior será a quantidade óssea ao envelhecer (EASTELL, 1999).

O pico de massa óssea é influenciado 1) pela dieta alimentar; 2) atividade física; 3) hormônios; 4) peso corporal; 5) fatores genéticos; 6) hábitos de vida; 7) medicamentos (principalmente corticóide). Assim, nem todas as mulheres na pós-menopausa apresentam acentuada diminuição de massa óssea (WASNICH, 1999).

Depois de atingido o "pico de massa óssea", a saúde dos ossos deve ser mantida através da prática de esportes, da manutenção de vitamina D, ingestão de níveis adequados de cálcio e fósforo. O fumo, o consumo excessivo de álcool e cafeína devem ser evitados, pois podem levar a um predomínio da reabsorção óssea sobre a formação óssea (MUNDY, 1999).

O uso de corticosteróides para asma ou artrite, assim como hormônios tireoidianos ou anticonvulsivantes por tempo prolongado, também são fatores de risco importantes, pois inibem o processo de síntese óssea (LUKERT, 1999).

Após os 40 anos de idade, a reabsorção é superior à formação e ocorre perda de massa óssea de 0.3 a 0.5% por ano, tanto em mulheres pré-menopausais quanto em homens (BOGLIOLO, 1993). Ocorre pequena redução na massa óssea de regiões como a coluna vertebral, antebraço e medidas totais do corpo, enquanto maior perda de massa óssea é observada na região da cabeça femural, no período pré-menopausal. No entanto, perda acelerada de massa óssea é observada depois da menopausa (5% ao ano), ou seguido de ovarectomia ou qualquer tipo de falência ovariana (LINDSAY, 1995).

A estrutura óssea consiste de placas e bastonetes conectados. Ossos de pessoas jovens têm estrutura normal, enquanto em pessoas idosas o volume trabecular é reduzido, com conseqüente reabsorção de placas ósseas, isto resulta em placas mais finas e perfuradas (WILKIN, 1999). No entanto, existem discussões sobre se ocorre o afinamento trabecular (MUNDY, 1999).

Portanto, a arquitetura óssea é comprometida pela progressiva erosão trabecular acarretando em fraqueza e em desconexão trabecular, as quais afetam a resposta do osso à tensão de compressão e à torção. A estabilidade elástica de placas, com buracos circulares, depende do tamanho dos buracos. Assim, o tamanho das

porosidades predispõem mais às fraturas do que o número de poros existentes nessas placas (ABE et al, 1999).

A presença de afinamento trabecular e/ou cortical e microfraturas podem diminuir a capacidade do osso em absorver energia, resultando em falência óssea mesmo sob condições normais de carga (CURREY, 1979). Portanto, a perda de massa óssea altera a microarquitetura óssea e, conseqüentemente, diminui sua capacidade em suportar carga. Assim, a microarquitetura óssea tem importante função em determinar as propriedades mecânicas dos ossos.

O remodelamento ósseo ocorre toda vez que o tecido ósseo necessita ser reparado com o objetivo de conservar a massa óssea em todas as suas características. Acredita-se que ao se renovar fibras colágenas velhas e fracas por fibras novas e fortes ocorre manutenção da alta resistência tensil dos ossos (GUYTON, 1988).

As mesmas células que foram responsáveis pela formação também atuam no remodelamento ósseo. Neste estágio, os osteoblastos e osteoclastos trabalham em conjunto, sendo denominados de unidade multicelular básica.

A manutenção da estrutura óssea não realizada de maneira adequada é responsável pelo aparecimento das doenças osteometabólicas, como a osteoporose que corresponde a 80% destas doenças no adulto (SZEJNFELD, 1997). Quanto mais baixo o pico de massa óssea alcançada, maior será o risco de desenvolver osteoporose. A diminuição de massa óssea também pode ocorrer devido à razão de perda óssea aumentada (EASTELL, 1999).

Os comprometimentos mais graves gerados pela osteoporose são as fraturas decorrentes da baixa densidade óssea, as quais podem afetar a independência do paciente e prejudicar seu convívio social, podendo levar ao óbito.

### 3.2 Biomecânica do osso

Carga mecânica promove deformação no osso e consequentemente gera um estímulo para uma resposta óssea local, já postulada por WOLLF em 1870. A força externa aplicada, por unidade de área do osso, pode ser classificada como compressão, tração e cisalhamento. Sob carga, estas forças aparecem de forma combinada (TURNER & BURR, 1993).

Deformação parece reduzir reabsorção óssea e estimular a formação. PEAD & LANYON (1989) observaram número aumentado de osteoblastos formando osso localmente, na região do periósteo, em resposta à carga.

Atividades diárias geram forças nesses tecidos e essas forças são ampliadas durante a prática de esportes, como atletismo e exercícios pesados (CHARMAN, 1990). O aumento da massa óssea relacionada à atividade física e sua diminuição ocorrida em pacientes acamados e em lesados medulares comprovam a grande influência do estímulo biofísico sobre o esqueleto. Portanto, o esqueleto humano é sensível aos estímulos físicos e ambientais e responde a eles através de alterações tanto na massa óssea quanto em sua arquitetura (DUNCAN & TURNER, 1995). Estímulo mecânico dinâmico é mais eficaz para a formação de osso, pois sob cargas estáticas, as células ósseas se acomodam, tornando-se menos responsivas aos estímulos (TURNER, 1998).

Acredita-se que, em adição aos estímulos mecânicos, a formação óssea seja regulada por inúmeros fatores sistêmicos e locais, dentre eles: esteróides sexuais, hormônio paratireoideano (PTH), calcitonina, hormônios de crescimento, prostaglandinas.

Os ossos e tecidos conjuntivos quando deformados geram potenciais elétricos locais, denominados "potenciais gerados por deformação" (SGPs). Além disso, esta deformação gera gradientes de pressão dentro dos canalículos ósseos e conseqüente deslocamento do fluxo de fluido intersticial existente neles (DUNCAN & TURNER, 1995). O aumento da deformação óssea provoca aumento do fluxo de fluido intersticial.

Estudos sugerem que a geração deste fluido é importante para que o osso perceba e responda aos estímulos mecânicos (DUNCAN & TURNER, 1995; BURGER & KLEIN-NULEND, 1998). Assim, deformação mecânica na matriz óssea é transmitida para as células ósseas, o que possibilita alterações na regulação da proliferação celular, diferenciação, morfogênese e expressão genética.

O fluxo cria força de cisalhamento sobre a membrana celular de osteócitos, os quais parecem agir como sensores de tensão óssea local (Figura 1).

Segundo FYHRIE & KIMURA (1999) o transporte de material através dos tecidos é de fundamental importância para a realização de funções e para o

metabolismo homeostático. Assim, hipotetizaram que a densidade do osso trabecular e cortical poderia estar relacionada com o transporte de metabólitos, e que carga mecânica aumentaria o suprimento destes metabólitos, da medula para a matriz óssea. Desta forma, o transporte rápido de metabólitos da superfície trabecular para o interior dela ocorre pela deformação mecânica. E com este transporte dificultado, a quantidade de matriz óssea tende a diminuir para garantir a sobrevivência de osteócitos situados no interior das trabéculas.

Portanto, é observado que a resposta óssea está relacionada com a deformação gerada no osso e a adaptação ocorrida é proporcional à carga aplicada.

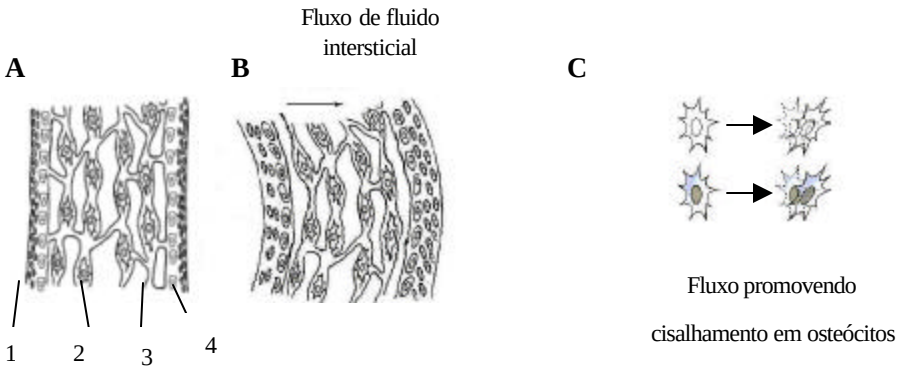



**FIGURA 1: Representação esquemática de osso. A) 1- periósteo; 2- osteócitos; 3- lacunas ósseas; 4- osteoblastos. B) Osso quando submetido à força externa se deforma, e consequentemente promove o deslocamento do fluido intersticial. C) Fluxo do fluido intersticial promovendo cisalhamento em osteócitos. Estímulo para remodelamento ósseo.**

### 3.3 Lesão Medular

A lesão medular acarreta alterações em vários sistemas orgânicos, incluindo o metabolismo de cálcio e o sistema ósseo (DEPARTMENT OF PHYSICAL MEDICINE AND REHABILITATION, 1997). Ocorre perda da função motora, geralmente irreversível, e diminuição da tensão mecânica sobre os ossos devido à paralisia. Ossos não submetidos à tensão se adaptam a esta nova situação, diminuindo a atividade de osteoblastos, enquanto ossos com maior tensão e maior

curvatura apresentam osteoblastos mais ativos e, assim, os ossos se tornam mais resistentes (GUYTON,1988). O estímulo mecânico é importante para estimular crescimento e remodelamento ósseo. Com o desuso, ocorre predomínio da reabsorção sobre a formação.

Embora parte da fisiopatologia da osteoporose em lesados medulares seja atribuída à falta de sustentação de peso e atividade física, esta difere da osteoporose tradicional pela lesão irreversível do sistema neuromuscular. O quadro clínico da osteoporose ocorre pelo aumento desproporcional da reabsorção por suprimir o controle inibitório sobre osteoclastos, ocorrendo desequilíbrio no remodelamento ósseo (GARLAND et al, 1992). Talvez ocorra também aumento local de interleucina 6 (IL-6), abaixo do nível da lesão, em pacientes paraplégicos (DEMULDER et al, 1998).

Acredita-se que, as alterações provocadas pela falta de suporte de peso seja muito mais prejudicial ao esqueleto que a falta de hormônio ovariano. Remoção aguda de carga mecânica causa uma diminuição mensal de 3% a 6% na massa dos ossos sob desuso, enquanto falta aguda de estrógeno causa diminuição anual de 4% a 5% de massa óssea (DEMULDER et al, 1998).

Em lesões completas de medula se observa uma maior perda óssea nos primeiros quatro meses. Em dezesseis meses a massa óssea se reduz a dois terços da quantidade original (GARLAND et al, 1992). No período entre dezesseis meses a dez anos a perda de massa óssea se estabiliza, e assim, massa óssea é conservada (GARLAND, 1992; SINAKI, 1995). Outros estudos têm demonstrado que em pessoas com lesão medular crônica o conteúdo mineral ósseo, comparado a indivíduos normais, diminui em 25%, no fêmur proximal e em 50% na tíbia proximal (BIERING-SORENSEN et al, 1988).

JONES et al (1998) observaram que pacientes paraplégicos apresentam diminuição significativa do conteúdo mineral ósseo (BMC), possuindo apenas 70% do BMC encontrado no grupo controle, mudanças estas que podem ser localizadas.

Tentativas para reverter o quadro de osteoporose em lesados medulares, utilizando dietas e drogas, não apresentaram muito sucesso. FREEMAN (1949) observou que tratamento com vitamina D, para prevenir ou reverter a perda de cálcio do esqueleto, não alterou a quantidade de excreção do mesmo. Estudos que

utilizaram calcitonina ou bifosfonato, em paraplégicos, apresentaram uma pequena melhora óssea. Muitos tratamentos ou exercícios como sustentação de peso e estimulação muscular podem ter mínimos impactos sobre a estimulação osteoblástica ou a inibição osteoclástica (WYSE & PATTEE, 1954; ABRAMSON & DELAGI, 1961, MOHR et al, 1997).

### 3.4 Aspectos Epidemiológicos e Sócio-Econômicos da Osteoporose

A osteoporose e a baixa densidade óssea são fatores de risco significativos para morbidade e mortalidade em adultos mais idosos, pois a fraqueza óssea aumenta a probabilidade de fraturas por eventos traumáticos leves (ULLOM, 1999).

O aumento dos casos de osteoporose é refletido principalmente na população idosa, geralmente em mulheres pós-menopausais. Sua ocorrência é menor em homens mas o risco existe. Segundo MUNDY (1999), nas sociedades ocidentais, a perda óssea relativa à idade afeta mais de 25% da população feminina e 5% a 10% da população masculina.

Segundo PASTORE (1997), no Brasil, 10 milhões de pessoas são atingidas pela doença, com a ocorrência de 80.000 casos de fratura de quadril anualmente. Estima-se que no Brasil, em 2025, a população na faixa etária a partir de 60 anos de idade será de 34 milhões de pessoas, o que equivalerá a 13,8% da população total (LEDERMAN & CARNEIRO, 1996). Dentre as pessoas acima de 60 anos de idade, 30% a 40% provavelmente têm osteoporose e aproximadamente 66% têm algum grau de osteopenia (BONE DENSITY MEASUREMENT - A SYSTEMATIC REVIEW, 1997).

Segundo KANNUS et al (1999), na Finlândia, 50% dos indivíduos acometidos por fraturas osteoporóticas se tornam totalmente dependentes. A expectativa de vida reduz-se de 12% a 20%, sendo que 5% a 20% morrem no primeiro ano após a primeira fratura, sobretudo, fratura de colo de fêmur que pode provocar complicações circulatórias, tromboembólicas e infecções respiratórias, podendo levar à morte. Além de seqüelas, a osteoporose pode resultar em baixa-estima e em diminuição da independência física.

Portanto, a fratura osteoporótica de quadril é, dentre todas, a mais grave devido ser dolorosa, geralmente necessitar de hospitalização e cirurgia, causar significativa morbidade e causar considerável mortalidade (VERSLUYSEN et al, 1986). As fraturas de quadril podem prejudicar o paciente a caminhar sem auxílio, acarretando em perda da independência, sendo que 6 meses depois da fratura de quadril, muitas pessoas idosas ainda precisam de assistência para realizar atividades da vida diária (MAROTTOLI et al, 1992).

Nos Estados Unidos a admissão hospitalar para fraturas de quadril e coluna vertebral aumenta 10 vezes entre 65 e 90 anos de idade (JACOBSEN et al, 1992). A cada ano, 1% das pessoas acima de 90 anos de idade são hospitalizadas por fratura osteoporótica, tornando alto o custo para administrá-la (ULLOM,1999). Em 1995, os custos médicos associados com fraturas de quadril, em mulheres e homens, foram entre 5.4 bilhões e 7.4 bilhões de dólares. Estima-se que em 2020, os custos com fratura de quadril chegarão a 62 bilhões de dólares (IQBAL, 2000). Segundo CUMMINGS et al (1990), dentro de 50 anos, este custo alcançará 240 bilhões de dólares.

### 3.5 Osteoporose

Mulheres pós menopausa perdem, nos primeiros cinco anos após a menopausa, entre 10% a 15% de osso. Depois deste período a porcentagem diminui, resultando ao final, perda total de 30% a 40% do pico de massa óssea (RECKER, 1993). Entre 30 e 40 anos após menopausa, as mulheres podem ter perdido 35% de seu osso cortical e 50% de osso trabecular (ROBBINS, 1994). Segundo LINDSAY et al (1980), ocorre perda óssea acelerada num período de 10 anos após a menopausa, mas é relativamente maior entre os 2 a 3 primeiros anos.

No entanto, muitas mulheres não apresentam significativa perda de massa óssea durante os anos após a menopausa e talvez 25% a 30% das mulheres não experimentem qualquer fratura em suas vidas. Estas mulheres, provavelmente, atingiram alto pico de massa óssea antes da menopausa, e/ou sofrem menos perda óssea após a menopausa (WASNICH, 1999). A probabilidade da ocorrência de

osteoporose está associada com os fatores de risco existentes naquela pessoa (Tabela 1).

**TABELA 1. Fatores de risco para osteoporose**

| | |
|---|---|
| Fatores genéticos | Raça/etnia<br>Sexo<br>História familiar |
| Dieta alimentar | Baixa ingestão de cálcio<br>Excessiva ingestão de cafeína<br>Alta ingestão protéica |
| Estilo de vida<br><br><br>Hormônios endógenos e<br>Doenças crônicas | Sedentarismo<br>Atividade sem sustentação de peso<br>Excessivo consumo de bebida alcóolica<br>Fumo<br>Idade de menopausa<br>Hipertiroidismo<br>Hipercortisolismo |

A osteoporose está principalmente relacionada com deficiência do hormônio ovariano nas mulheres pós menopausais, afetando um terço destas mulheres (JOHNELL, 1996). Alguns acreditam que dois terços do osso perdido em mulheres idosas está relacionado a menopausa e um terço à idade (RIGG et al, 1981). Figura 2 mostra um esquema sobre os diversos fatores que interferem no aparecimento da osteoporose.

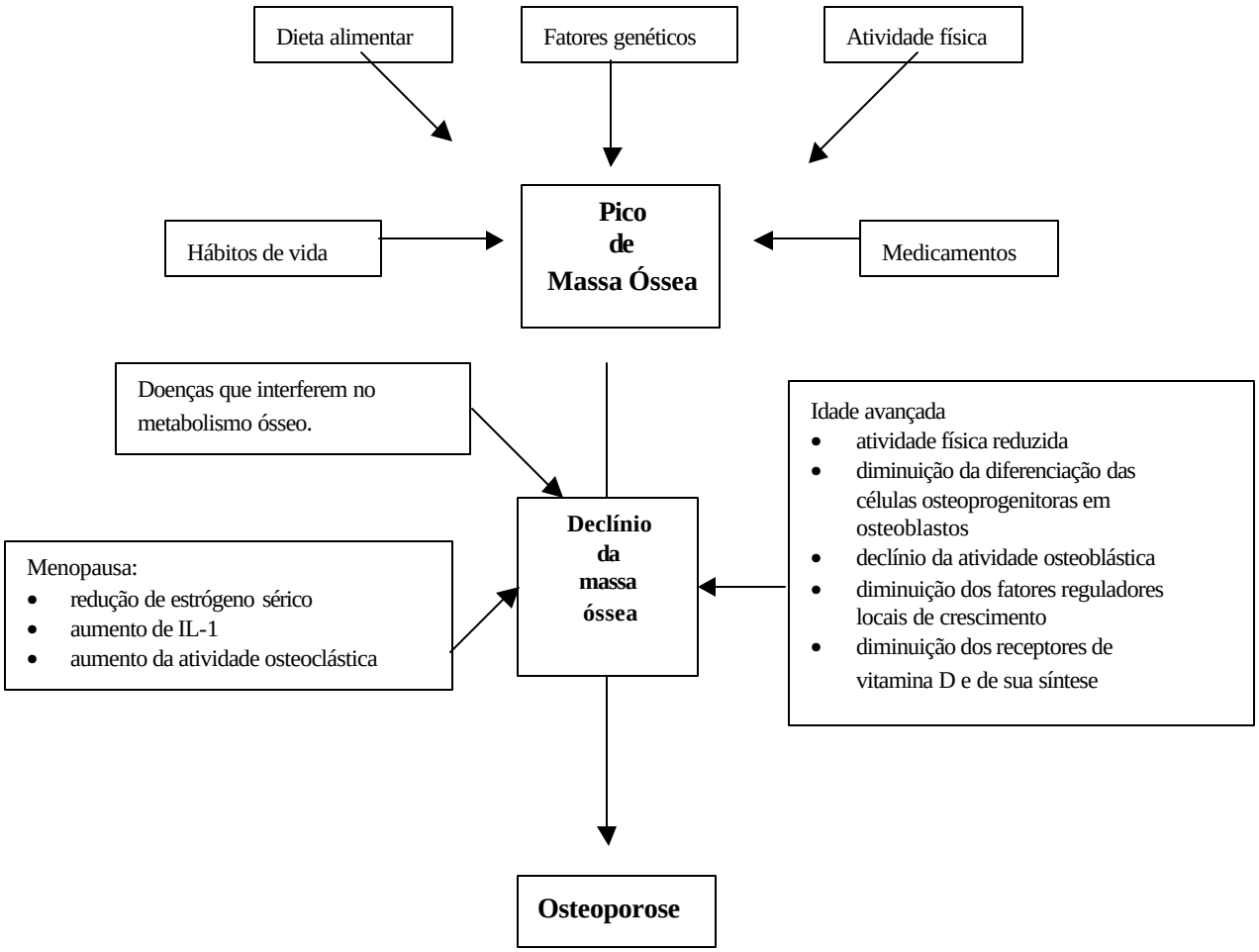



**FIGURA 2. Fatores que interferem na osteoporose**

A menor incidência de osteoporose nos homens é devido ao início tardio, ao redor dos 55 anos (EASTELL, 1999), e progressivamente mais lento do declínio de massa óssea. Não ocorre um período de rápida mudança hormonal, o que evita perda acelerada de massa óssea. As diferenças, entre os sexos, na geometria e remodelamento ósseo também contribuem para a menor taxa de osteoporose encontrada nos homens (RINGE, 1998).

O estrógeno tem efeito direto supressivo sobre atividade osteoclástica. Normalmente, receptores de estrógeno estão presentes nos osteoblastos. Quando o estrógeno se liga aos seus receptores, mediadores químicos são secretados, inibindo a atividade de osteoclastos (IQBAL, 2000). Estrógeno protege o osso contra a ação do

hormônio paratireoideano (PTH) e talvez interfira no aumento da síntese e secreção de diversos agentes que influenciam na formação óssea (LINDSAY,1995). O PTH é um potente hormônio de reabsorção óssea, o qual aumenta o número e atividade de osteoclastos, promovendo a liberação dos sais de cálcio dos ossos e aumento na absorção de cálcio pelo intestino e pelos túbulos renais. Sua função primária é a de regular a concentração do cálcio iônico nos líquidos extracelulares. No entanto, PTH também tem um pronunciado efeito estimulador sobre formação de osso trabecular quando administrado, de forma intermitente, em doses relativamente baixas (RODAN & RODAN, 1995).

Desta forma, o hormônio estrógeno possui importante função na homeostase do esqueleto, regulação da freqüência de novos ciclos de remodelamento e no equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (LINDSAY, 1995).

Com a menopausa, concentrações de estrógenos caem, possibilitando que osteoclastos se tornem hiperativos, penetrando profundamente dentro de placas esponjosas, perfurando-as (DEMPSTER & LINDSAY, 1993). Estas alterações promovem o desequilíbrio na atuação de osteoblastos e osteoclastos. Desta forma, o organismo não consegue fazer o remodelamento ósseo na mesma proporção que ocorre reabsorção, tornando o osso mais vulnerável. As trabéculas tornam-se mais separadas e a conectividade trabecular mais reduzida (DEMPSTER, 1995). Também ocorre, com a menopausa, uma diminuição importante do osso cortical, com afinamento e aumento de sua porosidade (DEMPSTER, 1995). Estas alterações microestruturais aumentam a incidência de fraturas, principalmente do colo do fêmur, vértebras e terço distal do rádio.

ARNOLD (1980) foi o primeiro a propor, através de análise qualitativa, que o aumento da porosidade trabecular é devido ao excessivo processo reabsortivo. PARFITT et al (1983) suspeitaram que o processo ocorre por aumento da profundidade das cavidades reabsorvidas por osteoclastos, que guiam para perfurações focais de placas trabeculares. SIMS et al (1996) observaram que ratos submetidos à ovarectomia, entre o 9° e 15° dia após-ovarectomia, apresentaram número trabecular diminuído, sem alteração detectável na espessura trabecular. Estes resultados mostraram que após a rápida perfuração trabecular, o processo de reabsorção óssea continua até a completa remoção da trabécula.

Para tentar reverter o aumento da reabsorção óssea ocorre ativação osteoblástica compensatória, a qual não é suficiente para evitar o desequilíbrio entre formação e reabsorção (GUYTON, 1988).

A osteoporose se desenvolve, inicialmente, de forma assintomática (CANTARELLI, 1997), por isso, é denominada por alguns autores como SAVILLE (1941), citado por DANOWSKI, 1996, como "epidemia silenciosa do século XX" ou "doença traiçoeira", o que torna difícil o seu diagnóstico.

A ocorrência de colapso vertebral ou de fratura provocados por tensão, impacto ou queda, geralmente associados à fragilidade óssea, possibilita detectar a osteoporose. Também pode se tornar evidente através da diminuição de estatura, deformidades posturais (como aumento da cifose torácica) e dor, principalmente resultante tanto do pinçamento de raízes nervosas provenientes do achatamento de vértebras quanto de microfraturas (MUNDY, 1999).

Os sinais radiológicos da osteoporose são tardios, só aparecendo sinais de perda óssea quando a perda existente é de 30% a 40% da massa óssea (ARDRAN, 1951; SZEJNFELD, 1997), neste mesmo período, também aparecem as primeiras manifestações clínicas (DANOWSKI, 1996). Outro fator desafiador para avaliação da radiografia é a grande dependência da imagem obtida com a técnica utilizada (IQBAL, 2000).

Muitos autores acreditam que pessoas com osteoporose estão mais propensas às quedas e conseqüentes fraturas, devido ao aumento do desequilíbrio e das oscilações posturais (LYNN, 1997). MELTON & RIGGS (1985) concluíram que baixa densidade óssea combinada com movimentos de proteção mais lentos, pode explicar a maior incidência de fraturas em pessoas idosas durante quedas. As quedas também estão associadas com uso de sedativos, prejuízos cognitivos, desordens de força e propriocepção das pernas, problemas de equilíbrio e marcha e problemas ortopédicos.

A osteoporose também pode causar perda da auto-estima, necessidade de mudar costumes diários, medo de fratura e de perder independência e outros problemas psicossociais e físicos (GOLD & DREZNER, 1995).

### 3.6 Diagnóstico

Embora a avaliação clínica, que investiga os fatores de risco associados a uma determinada pessoa, possa determinar pacientes com alta probabilidade de desenvolver osteoporose, é através da medida de densidade mineral óssea que se obtém maior exatidão do problema.

O método mais usado atualmente para avaliação da densidade mineral óssea (BMD) é a densitometria óssea, a qual é um teste simples, não invasivo, indolor e com baixa emissão de radiação. As regiões mais importantes para avaliação do BMD são colo do fêmur, coluna vertebral baixa (região lombar) e ossos do punho, pois são as regiões mais suscetíveis às fraturas. Pode-se também medir BMD total do corpo (CONSENSUS DEVELOPMENT CENTER, 1991). Pode ser utilizada para decidir sobre a prescrição do tratamento, monitorar o progresso da perda óssea e analisar os efeitos da terapia adotada.

No entanto, existem outros métodos de diagnóstico, tais como tomografia computadorizada, que possibilita determinar o conteúdo mineral ósseo na coluna vertebral; ultra-som, que avalia a densidade mineral óssea e marcos bioquímicos, que possibilitam avaliar a razão de remodelamento ósseo.

A perda de massa óssea pode ser determinada pela medida do conteúdo mineral ósseo (BMC) e da densidade mineral óssea (BMD), as quais fornecem uma estimativa da massa óssea. A unidade de massa óssea é dada em g/cm de mineral (conteúdo mineral), sendo a densidade óssea expressa em $g/cm^2$, ou seja, densidade da área estudada. A unidade mais importante do estudo é a densidade, podendo ser relacionada com padrões de normalidade, tanto em relação a uma população de adultos jovens (pico de massa óssea), quanto em relação a uma população de indivíduos normais da mesma idade, sexo, raça, peso do paciente (SZEJNFELD, 1997).

Depois de obtida a densidade óssea, esta é comparada com valores encontrados em pessoas jovens normais, com o objetivo de verificar se o valor obtido pelo método diagnóstico está abaixo do normal. Quanto menor a densidade óssea maior será o risco de fraturas decorrentes da osteoporose.

Foi estabelecido um limiar de fratura, que é basicamente um valor de corte (valores aceitos) do BMD, onde a maior parte das fraturas osteoporóticas estão incluídas. Os valores de corte são arbitrários, mas se um valor de massa óssea, comparado com a média do adulto jovem, estiver $-2{,}5$ desvios padrões (DP) é indicativo de mulheres com osteoporose. Uma diminuição menos intensa de massa óssea é classificada como osteopenia.

Desta forma, existem várias classificações para a quantidade de massa óssea:

a) Normal: valor de BMD ou BMC dentro de 1 DP da média do adulto jovem de referência;
b) Baixa massa óssea (osteopenia): valor de BMD ou BMC entre $-1{,}0$ e $-2{,}5$ DP da média utilizada;
c) Osteoporose: valor de BMD ou BMC abaixo de $-2{,}5$ DP da média utilizada;
d) Osteoporose grave: valor de BMD ou BMC abaixo de $-2{,}5$ DP associado com fratura.

### 3.7 Tratamento

Algumas mulheres possuem maior risco de desenvolver osteoporose que outras, dependendo dos fatores de risco associados a elas.

O tratamento preventivo e o diagnóstico precoce da osteoporose são essenciais para um tratamento mais efetivo, sabendo-se que as condições normais do osso não conseguem ser recuperados com o quadro de osteoporose já instalado (DRIUSSO, 2000). Desta forma, o tratamento tem o objetivo de restaurar a massa óssea em um ponto em que o risco de fratura seja substancialmente revertido (CHESNUT, 1995). Entretanto, tratamentos que promovem aumento da massa óssea não estão, necessariamente, associados a restauração da microarquitetura e força mecânica normais (DEMPSTER, 1995).

- ***Terapia de reposição hormonal***

A terapia de reposição hormonal está entre os tratamentos farmacológicos mais utilizados pelas mulheres menopausais. Visa restabelecer a condição hormonal

anterior à menopausa, tendo a função de proteger os ossos contra a rápida perda óssea que ocorre a partir da menopausa. Protege contra doenças cardíacas, pois aumenta o colesterol HDL e diminui o colesterol LDL. Pode diminuir o risco relativo de doenças cardíacas em 50% (STAMPFER & COLDITZ, 1991; BUSH et al, 1987).

Esta terapia atua também na diminuição dos sintomas da menopausa, como ondas de calor, irritabilidade, distúrbios de sono, dores-de-cabeça e irritação vaginal.

A terapia de reposição hormonal pode diminuir 50% a 80% na ocorrência de fraturas vertebrais (CONSENSUS DEVELOPMENT CENTER, 1991), e parece reduzir em 20% a 60% o risco de fratura de quadril (DAWSON-HUGHES, 1999).

A maior preocupação proveniente da terapia de reposição de estrógeno é o aumento do risco de desenvolver câncer de mama (FONTANA & DELMAS, 1999). Há evidências de que o longo período de tratamento com hormônios ovarianos (acima de 10 anos) pode aumentar o risco de câncer de mama em 10% a 30% (LINDSAY, 1999).

Existem vários outros tratamentos, geralmente farmacológicos, para prevenir ou melhorar o quadro de osteoporose, sem proporcionar os riscos da terapia de reposição hormonal, mas que geralmente provocam outros sintomas colaterais. Assim, em alguns casos como a reposição hormonal, estes medicamentos são contra-indicados, mal tolerados ou não alcançam as metas desejáveis. Incluem medicamentos que inibem reabsorção óssea (calcitonina, bifosfonatos), estimuladores de formação óssea (vitamina D, fluoreto de sódio, andrógenos e raloxifene) e substâncias complementares (cálcio) (SZEJNFELD, 1997). Tratamentos alternativos, não invasivos, podem ser a melhor forma de evitar problemas adicionais às pacientes. Podem-se tornar um método de tratamento da osteoporose em homens, devido à menor quantidade de tratamentos disponíveis para eles (BONE DENSITY MEASUREMENT - A SYSTEMATIC REVIEW, 1997).

A terapia com ultra-som de baixa intensidade para quadros clínicos de osteoporose, proposto por este trabalho, talvez possa se tornar um tratamento efetivo na diminuição de perda de massa óssea com conseqüente diminuição de sua fragilidade.

### 3.8. Ultra-som

O ultra-som é uma forma de energia mecânica, que se propaga por ondas de pressão acústica de alta freqüência que, ao serem transmitidas para o interior do corpo, promovem microdeformações na região óssea estimulada. Esta força externa é capaz de gerar estímulos para acelerar ou iniciar o processo osteogênico, através de eventos bioquímicos ocorridos nas células. Há estudos que mostram o efeito do ultra-som sobre a regeneração óssea (DUARTE, 1983; XAVIER & DUARTE, 1983; DYSON & BROOKES, 1983; COLOMBO, 1992).

O ultra-som, como método terapêutico para estimular a osteogênese, tem como base fisiológica as propriedades biomecânicas do osso, pois tanto o estímulo mecânico quanto o ultra-som provocam deformações nos ossos (KRISTIANSEN et al, 1997; NARUSE et al, 2000).

BASSET (1965) mostrou que a formação de cargas elétricas na superfície celular, decorrente da aplicação de estimulação elétrica, faz com que os potenciais de membrana dos osteoblastos se alterem permitindo a captação de nutrientes e um bombeamento de íons. As células atuam então, como um transdutor biológico, onde uma maior atividade mitótica da célula é produzida pelo estímulo elétrico.

Utilizando o ultra-som de baixa intensidade como um método não invasivo em osteotomias de fíbulas e em perfurações nos fêmures de coelhos, DUARTE (1983) obteve aceleração da osteogênese. O ultra-som foi aplicado durante 4 a 18 dias, por 15 minutos diários. Foi observado, através de análises radiográficas e histológicas, que nos ossos osteotomizados ocorreu rápido aumento do calo ósseo após 10 a 12 dias de tratamento, estabilizando após este período. Ao contrário do grupo controle, que apresentou nos primeiros 10 a 12 dias um lento aumento do calo ósseo, com o processo de crescimento acentuando após este período. Não foram observados efeitos térmicos e de cavitação significativos.

XAVIER & DUARTE (1983) utilizando o método proposto por DUARTE (1983) em pseudartrose e/ou retardo de consolidação óssea, obtiveram 70% de sucesso nos casos clínicos tratados.

SILVA (1987) propôs que aplicação de ultra-som, em regiões com fraturas ósseas, pode promover aumento do influxo de certos íons envolvidos com o próprio

ciclo celular. Mudanças na permeabilidade podem refletir-se na ativação do canal iônico da membrana celular devido à perturbação. Isto poderia resultar num maior influxo de íons cálcio para o interior da célula (MORTIMER & DYSON, 1988). Desta forma, pode diminuir o tempo necessário para a consolidação de uma fratura óssea devido à maior quantidade de íons intracelulares. BOLANDER (1997) mostrou que o ultra-som de baixa intensidade promove alteração do fluxo de cálcio dentro de alguns segundos após a aplicação.

PILLA et al (1990) mostraram que a utilização de ultra-som de baixa intensidade (30 $mW/cm^2$), 20 minutos diários, em modelo de osteotomia de fíbulas de coelhos, foi capaz de acelerar o processo de cura óssea, como também se mostrou eficaz na promoção de formação óssea tão forte quanto o lado contralateral. Foi observado que a integridade biomecânica, das fíbulas estimuladas, foram alcançadas na metade do tempo quando comparada com o grupo não estimulado.

Estudos mostraram que o ultra-som de baixa intensidade promove aumento do fluxo sangüíneo na região da fratura (GOLDBERG, 1997, RYABY et al, 1991). RAWOOL et al (1997) observaram que a aplicação de ultra-som, em cães, promoveu aumento da vascularização que começou após o primeiro dia de tratamento e permaneceu mais significativo nas duas primeiras semanas de tratamento. Este efeito foi direto e persistente. Esta alteração vascular facilita a liberação de componentes essenciais (como fatores de crescimento) para uma cura normal e proporciona diminuição no tempo necessário para regeneração da fratura (HADJIARGYROU et al, 1998).

KRISTIANSEN et al (1997), em estudo clínico, mostraram que ultra-som de baixa intensidade diminuiu o tempo de cura de fraturas recentes, na região distal do rádio, quando comparado com o grupo placebo. A organização trabecular também foi acentuada no grupo tratado. Outros estudos também observaram diminuição no tempo de cura em fraturas recentes (HECKMAN et al, 1994; KRISTIANSEN et al, 1997).

Estudos também apontaram efeitos benéficos da utilização do ultra-som de baixa intensidade em regiões fraturadas, para o aumento da resistência à torção óssea comparada com o grupo controle. WANG et al (1994) utilizaram ultra-som de baixa intensidade (30$mW/cm^2$, 15 minutos diários) em fratura femural em ratos, e

mostraram que o torque máximo médio se apresentou 22% superior ao encontrado no lado contralateral não fraturado. ITO et al (1998) e JINGUISHI et al (1998) observaram, em modelo de fratura femural em ratos, aumento do conteúdo mineral ósseo e da densidade, torque máximo e processo de ossificação endocondral acelerado através do tratamento com ultra-som de baixa intensidade, com largura de pulso de 200µs e freqüência de 1KHz. Estes parâmetros foram apontados serem mais eficazes para a cura de fratura e para o estímulo da osteocondução, respectivamente.

O ultra-som de baixa intensidade é eficaz na cura de fraturas em pacientes que possuem patologias que interferem na recuperação óssea, como diabetes, osteoporose, fumo e álcool. FRANKEL (1998) observou em seu estudo que pacientes osteoporóticos, com fraturas, submetidos ao tratamento com ultra-som obtiveram razão de cura de 95%. Dos 162 pacientes tratados 154 foram curados. MAYR et al (2000) mostraram que em casos de não-uniões e uniões ósseas demoradas, em pacientes com doenças que afetam metabolismo ósseo, o tratamento com ultra-som promove baixa razão de cura em doenças renais (76%) e insuficiência vascular (70%), quando comparados com as razões de cura satisfatórias em diabetes (87%), em osteoporose (87%) e em infecções locais (100%).

Ultra-som modula a síntese de fator beta transformador do crescimento (TGF-β), importante fator de crescimento envolvido na formação de osso e cartilagem, o qual afeta a proliferação de osteoblastos, sua diferenciação e síntese da matriz óssea (RYABY et al, 1992). Também deve ter efeito sobre a expressão de genes específicos envolvidos no processo de cura (HADJIARGYROU et al, 1998). Além disso, o ultra-som não possui contra-indicações (KRISTIANSEN et al, 1997; HADJIARGYROU et al, 1998).

SPADARO & ALBANESE (1998) estudaram o efeito do ultra-som de baixa intensidade em ossos longos de ratos em crescimento, durante 4 semanas, com aplicação diária de 20 minutos. Os resultados mostraram que o ultra-som não interferiu no crescimento do fêmur e da tíbia como também não proporcionou aumento da densidade mineral óssea. O insucesso do experimento pode ter sido causado pela falta de alguns fatores, liberados em casos de fraturas ósseas, necessários para a interação do ultra-som com cartilagem e células ósseas. Fator β transformador do crescimento pode ser o principal fator para mediar os efeitos ultra-

sônicos devido ao seu provável efeito regulador no reparo de fraturas. Presumiram também que, em casos de fratura, o ultra-som consegue ter melhor acesso às células periosteais e endosteais do que quando em membros intactos. Concluíram que, o efeito positivo do ultra-som é mais provável acontecer em casos de fraturas que em casos da ausência de fratura ou outro trauma ósseo.

No entanto, ARAI et al (1993) aplicaram ultra-som de baixa intensidade, na região do colo do fêmur durante 4 semanas por 20 minutos diários, em cinco pacientes com osteoporose sem fraturas ósseas. Observaram através da densitometria mineral óssea por DEXA (dual energy X- Ray absorptiometry), em quatro casos, melhora da densidade mineral óssea do colo femural (média de 8,9%) e diminuição de 4% da densidade mineral óssea nas regiões não submetidas ao tratamento.

### 3.9 Modelo de rata madura

O rato foi escolhido para o experimento por vários motivos, dentre eles (FROST & JEE, 1992):

- O mecanismo biológico do crescimento ósseo é similar para os ratos e crianças;
- Como já demonstrado em experimentos anteriores, o osso do rato assim como o do homem, não cresce continuamente durante a sua vida (KALU, 1991; YU et al, 1982; BERG & HARMISON, 1957). No rato, ocorre um rápido crescimento até 6 meses de idade. Observa-se aumento rápido do comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio no fêmur de 1a 3 meses de idade; depois deste período, a razão de crescimento se torna mais gradual (KALU, 1991). O crescimento se torna insignificante de 6 a 12 meses e cessa aos 18 meses. Modelo de rata idosa não possui mais crescimento ósseo devido ao fato de já ter estabelecido a maturidade óssea. O modelo de rata idosa possui características de perda óssea semelhantes às que ocorrem na pós-menopausa humana.

No entanto, ratas idosas são caras, sua disponibilidade é limitada e longo período decorre antes que se manifestem os efeitos da ovarectomia sobre seus ossos. Em contraste, ratas mais jovens (aproximadamente 3 meses de idade) não são muito caras, são facilmente disponíveis e os efeitos da ovarectomia sobre seus esqueletos se

manifestam em um mês ou menos. As características da perda óssea são, geralmente, semelhantes àqueles modelos de ratas idosas (KALU, 1991).

- Em ratos e em humanos adultos ocorre o mesmo mecanismo biológico para conservação óssea. A preservação ou aumento da remoção óssea ocorre de forma similar.
- Em relação ao reparo ósseo, o rato também provê um bom modelo para análise de agentes na regeneração desta estrutura corporal.

A osteopenia (ou redução da massa óssea ou banco ósseo) significa esqueleto com menos tecido ósseo comparado com o normal e, nesta condição, atividade normal não causa fraturas espontâneas ou dores ósseas, só ocorrendo após queda ou impactos maiores (FROST, 1997). A osteoporose significa doença que combina à osteopenia evidências clínicas do excesso de fragilidade do osso, acarretando fraturas espontâneas ou dores ósseas durante atividades físicas normais (FROST & JEE, 1992). Os estudos que induzem deficiência do hormônio ovariano em ratas observam o não aparecimento de fraturas, portanto, instala-se um quadro clínico de osteopenia em ratas castradas (KALU, 1991).

A osteopenia pode estar associada com a idade, desuso mecânico e nas mulheres com a carência de estrógeno. Nas ratas ovarectomizadas, a prevenção de osteopenia com estrógeno também parece ter efeito semelhante ao da mulher.

DEVLIN et al (1990) observaram aumento da profundidade de erosão seguido a perda da função ovariana em ratos. Os efeitos da ovarectomia em esqueleto de ratas maduras são observados nas primeiras duas semanas após cirurgia, com ocorrência de diminuição óssea e aumento da reabsorção óssea. ROUDEBUSH (1993), num estudo longitudinal com ratas ovarectomizadas recebendo alimentação *ad libitum*, observou uma diminuição significativa da densidade óssea em ratas após 2, 4 e 6 semanas após ovarectomia.

Volume de osso trabecular está significativamente diminuído em ratas ovarectomizadas no décimo quarto dia devido ao osso se tornar mais fino e perder trabéculas individuais. A partir do décimo dia após ovarectomia, é possível observar aumento do número de osteoclastos (THOMPSON et al, 1995).

DEMPSTER et al (1995) analisaram as mudanças temporais ocorridas na estrutura óssea trabecular de ratos maduros, com 6 meses de idade, imediatamente após a ovarectomia. Observaram declínio rápido do volume e densidade ósseas trabeculares nos primeiros 40 dias após a cirurgia, e após este período de tempo, a diminuição ocorreu mais lentamente. No entanto, no mesmo período de tempo, não observaram alterações na região de diáfise do fêmur, onde predomina osso cortical. O aumento de perda óssea trabecular foi conseqüência do aumento da reabsorção óssea, confirmada pelo aumento do número de osteoclastos, evidente nos primeiros 5 dias após a ovarectomia, com atraso de resposta de formação óssea entre 5 a 10 dias depois da cirurgia. Concluíram, através da análise estrutural, que a diminuição do osso trabecular foi decorrente da redução do número de placas e conectividades trabeculares, sem alterações significativas na espessura trabecular. Assim, sugeriram a existência de um mecanismo de perfuração das placas trabeculares seguida de sua total remoção.

THOMPSON et al (1995) observaram aumento do peso corpóreo em ratas ovarectomizadas, no primeiro mês após cirurgia quando comparado com controle falso-operadas, sendo esta resposta causada totalmente pelo aumento de gordura no corpo.

Aumento da razão de formação óssea foi observado por TANIZAWA et al (2000) 10 dias após a ovarectomia, tornando-se significativamente maior após 14 dias e permanecendo alto até o dia 30 da cirurgia. Este aumento da formação óssea foi explicado pela ativação de fatores de crescimento, como TGF-β e fator de crescimento similar à insulina, liberados da matriz óssea no momento da reabsorção. No entanto, o aumento da formação não foi capaz de compensar o aumento da reabsorção óssea causada pela deficiência de hormônio estrógeno, assim volume ósseo e número trabecular continuaram diminuindo até o 30° dia após a ovarectomia.

WRONSKI & YEN (1991); KALU (1991); FROST & JEE (1992) mostraram que a ovarectomia em ratas acarreta perda de osso esponjoso na tíbia e vértebra lombar devido à deficiência de hormônio estrógeno. O mecanismo aceito para perda óssea por deficiência de hormônio estrógeno no esqueleto de ratas se baseia num desequilíbrio na formação, com reabsorção excedendo formação óssea. Entretanto, osso cortical não é muito sensível para perda óssea após ovarectomia, corroborando

com maior perda de osso trabecular que cortical em mulheres pós-menopausais (KALU, 1991).

POHLMAN et al (1985) observaram, ao avaliar a força da diáfise femural através de ensaio mecânico, que as ratas embora osteopênicas não apresentaram diferenças significativas na força máxima da região cortical quando comparadas com grupo controle. Portanto, também confirmando a menor diminuição de osso cortical após ovarectomia.

No entanto, com a ovarectomia ocorre diminuição pronunciada da força óssea no colo femural devido à diminuição rápida de osso trabecular existente nesta região (PENG et al, 1994). MOYLE et al (1986) observaram, através de ensaio de compressão em fêmures de ganso, que a diminuição da resistência à ruptura dos ossos ocorre por deficiência de cálcio.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho é experimental, usando um modelo de osteopenia em ratas maduras castradas.

### 4.1. Animais

Os animais da raça Holstman (*Rattus norvegicus albinus*) foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP e mantidos em gaiolas de polietileno com água e ração *ad libitum*. Foram solicitadas fêmeas isogênicas com cerca de 200 gramas de massa corpórea.

### 4.2. Procedimento Cirúrgico Experimental

#### 4.2.1. Procedimento Utilizado em Estudo Piloto

O estudo piloto teve como objetivo verificar se o período de 30 dias para indução de osteopenia, em modelo de rata madura, corrobora os resultados encontrados na literatura, cujos experimentos observaram diminuição do conteúdo mineral ósseo em 1 mês após ovarectomia e histerectomia em ratas.

##### 4.2.1.1. Cirurgia no Estudo Piloto

As ratas foram submetidas à anestesia intramuscular, composta por Virbaxil 2%, na dose 0,04 ml/100g que possui efeito relaxante, sedativo e analgésico, e por Francotar na dose de 0,08 ml/100g que possui efeito analgésico. Logo após foi realizada a tricotomia no baixo ventre utilizando lâmina (Figura 3).

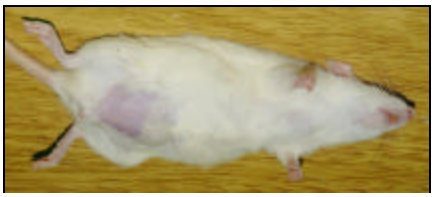


**FIGURA. 3. Tricotomia realizada no baixo ventre.**

A área tricotomizada foi esterilizada com álcool iodado 5% e, a seguir, foi feita a incisão utilizando lâmina de bisturi (Figura 4).

**FIGURA 4. A) Incisão realizada na pele, B) Incisão realizada na camada muscular.**

Após a incisão, foi realizada uma pequena sutura na base uterina, seguida pela ovarectomia bilateral e histerectomia, utilizando fio reabsorvível Categute Cromado (3-0) (Figura 5). No final do procedimento, foram realizadas as suturas internas com fio reabsorvível e suturas externas com fio de nylon (não reabsorvível) (Figura 6).

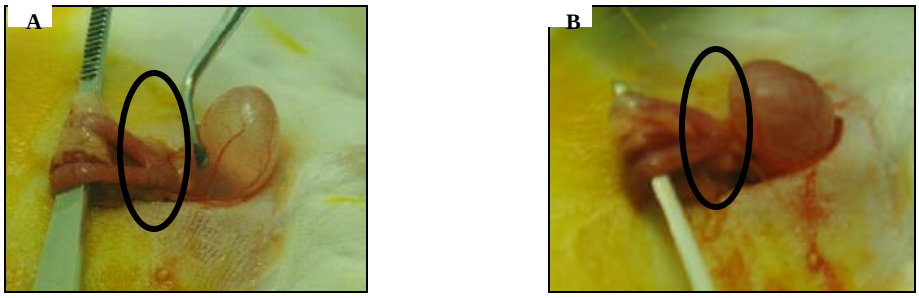



**FIGURA 5. A) Região da base uterina onde foi realizada a sutura, B) Base uterina suturada**

Após a cirurgia, as ratas foram acondicionadas no biotério da Bioengenharia - EESC, por 30 dias, visando induzir o quadro de osteopenia.

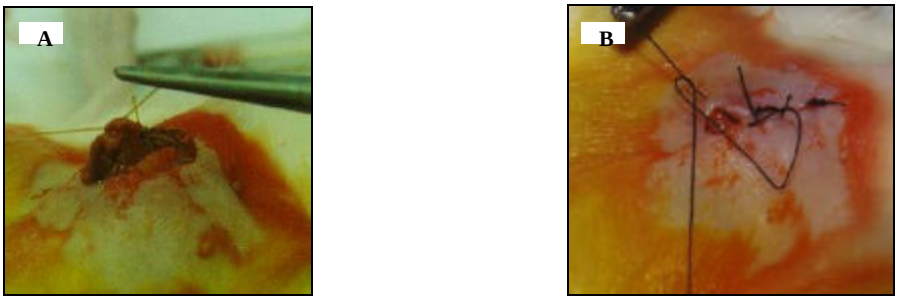



**FIGURA 6. A) Sutura interna, B) Sutura externa.**

O estudo piloto foi composto por dois grupos: pelo grupo controle (5 animais) composto por ratas não submetidas ao procedimento cirúrgico e pelo grupo de ratas ovarectomizadas (6 animais).

No 31° dia após a cirurgia de ovarectomia, as ratas foram sacrificadas, seus fêmures esquerdos retirados, submetidos ao teste mecânico e preparados para análise quantitativa de cálcio e fósforo. Os fêmures direitos foram separados para análise histológica.

### 4.2.2. Procedimento cirúrgico final

Foram utilizadas 34 ratas isogênicas, de idade adulta, da raça Hostman (*Rattus norvegicus albinus*) com massa corpórea de 200 gramas. Foram seguidos os mesmos procedimentos da cirurgia piloto.

## 4.3. Tratamento

As ratas ovarectomizadas foram divididas em dois grupos experimentais: o tratado com ultra-som pulsado de baixa intensidade e o placebo (sem tratamento).

O ultra-som utilizado apresenta as seguintes características (Figura 7):

- ❖ Freqüência = 1,5 MHz
- ❖ Freqüência de repetição = 1 KHz
- ❖ Ciclo de trabalho = 20%
- ❖ Largura de pulso = 200 microsegundos
- ❖ Período "off" = 800 microsegundos
- ❖ Intensidade = 30 mW/cm$^2$

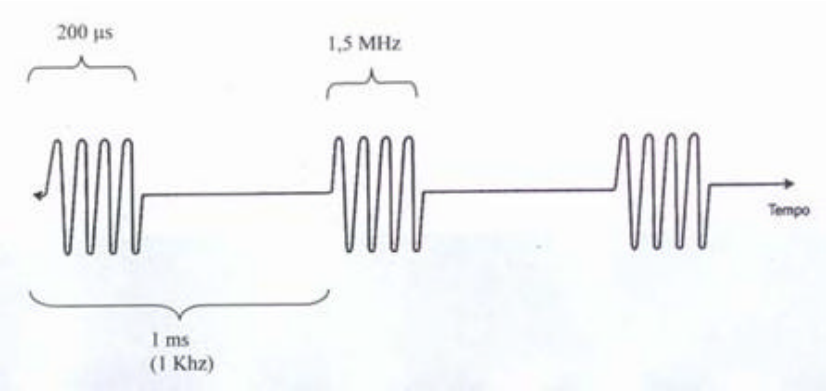



**FIGURA 7. Ultra-som pulsado de baixa intensidade**

No grupo experimental tratado (25 animais), as ratas osteopênicas foram submetidas a aplicações de ultra-som pulsado com intensidade espacial e temporal média de 30 mW/cm$^2$. O equipamento utilizado foi fixado na mesa de suporte, onde as ratas eram imobilizadas (Figura 8). O cabeçote possuiu dimensões normais para possibilitar que a aplicação de ultra-som fosse realizada ao mesmo tempo, em ambas patas traseiras, abrangendo a região desde a cabeça femural até terço distal do fêmur. Foi utilizado gel para facilitar a condução do campo ultra-sônico (Figura 9). Calibração do equipamento foi realizada previamente à sua utilização no experimento.

Os tratamentos iniciaram no 31° dia após a ovarectomia. Tiveram duração de 20 minutos, durante 20 dias consecutivos.

No grupo placebo (9 animais) os animais não receberam tratamento ultra-sônico, mas sofreram as mesmas interferências que o estresse pode causar aos animais. Para isso, permaneceram durante 20 minutos imobilizados, por 20 dias consecutivos.

Os sacrifícios ocorreram 1 dia após o término do tratamento, utilizando éter.

**FIGURA 8. Equipamento de ultra-som de baixa intensidade com o cabeçote acoplado na região inferior da mesa utilizada para imobilizar os animais.**

**FIGURA 9. Animais colocados na mesa de suporte, com o cabeçote de ultra-som sob as regiões do colo do fêmur de ambas as patas.**

### 4.4. Métodos de Avaliação

#### 4.4.1. Massa Corpórea

Foram ponderadas as massas corpóreas das ratas no início e no final do experimento. No estudo piloto foram consideradas as massas corpóreas no início e após 30 dias do ato cirúrgico para as ratas do grupo ovarectomizado e durante o mesmo período de tempo para aquelas do grupo controle. No estudo experimental foram consideradas as massas iniciais obtidas no dia do procedimento cirúrgico e as finais obtidas no dia do sacrifício.

### 4.4.2. Ensaio Mecânico

Foram realizados ensaios mecânicos de flexão em três pontos, nos diferentes grupos experimentais, para determinar as propriedades mecânicas dos ossos. Para o teste, os fêmures esquerdos foram retirados, limpados, banhados em água deionizada e mantidos em formaldeído 10%, durante 48 horas. Os ossos foram apoiados em suas extremidades, sobre dois suportes distanciados 18mm. A velocidade de aplicação da carga foi 5mm/min e utilizada célula de carga de 100 Kgf (Fig. 10). Para cada aumento de carga aplicada no osso se obtém a deformação gerada, o que possibilita a construção do gráfico carga *versus* deformação (SOGAARD et al, 1994; PENG et al, 1994). Através do gráfico e utilizando um software de análise de dados, chamado Mathematica versão 2.2, foram analisadas propriedades mecânicas como: limite máximo, rigidez, resiliência e tenacidade (Fig. 11).

Todos os fêmures das ratas do estudo piloto foram testados. No estudo experimental foram testados todos os fêmures do grupo placebo, mas apenas 12 fêmures das ratas submetidas ao tratamento. Foi utilizado equipamento MTS modelo TestStart II para ensaio mecânico. O teste foi realizado no Departamento de Engenharia Mecânica/UNICAMP.

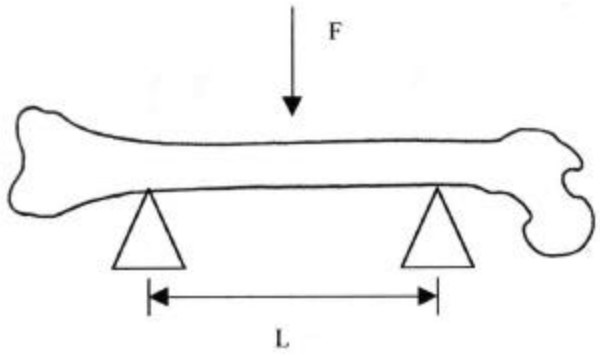



**FIGURA 10. Desenho esquemático mostrando o osso apoiado em suas extremidades por uma distância "L" entre os dois suportes, com a aplicação de uma carga "F" .**

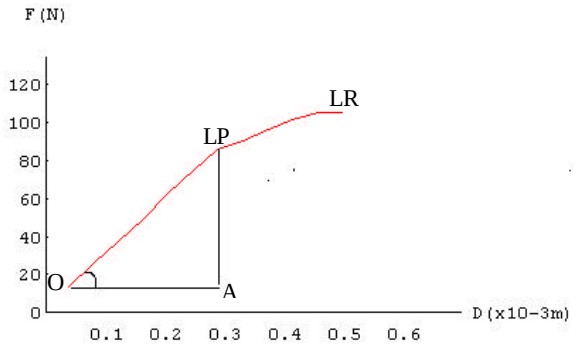



**FIGURA 11. Exemplo de gráfico carga versus deformação. LP: limite proporcional (ponto final da região elástica); LR: limite de ruptura (limite máximo); área do triângulo O-A-LP: resiliência; tangente do ângulo O: rigidez; área total sob a curva O-LP-LR: tenacidade**

#### 4.4.2.1. Limite máximo

O limite máximo é o maior valor de carga necessário para alcançar a resistência final do osso, o que provoca a falência óssea.

#### 4.4.2.2. Rigidez

A rigidez é obtida através do cálculo da inclinação da curva carga *versus* deformação na região linear e é dada pela equação:

$$R = \frac{LP - A}{A - O}$$

#### 4.4.2.3. Resiliência

Resiliência é a capacidade do osso em absorver energia de forma elástica, permitindo-o retornar à sua forma anterior após a retirada da carga. Para obtenção da resiliência calcula-se a área abaixo da curva carga *versus* deformação da região elástica.

#### 4.4.2.4. Tenacidade

Tenacidade é a capacidade do osso em absorver energia até sua ruptura. Para obtenção da tenacidade calcula-se a área total abaixo da curva carga *versus* deformação.

### 4.4.3. Análise de cálcio/ fósforo

As análises quantitativas de cálcio e fósforo, da região proximal dos fêmures, foram realizadas na EMBRAPA Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, devido à carência de equipamentos necessários para o método de análise escolhido e profissionais especializados para a realização do mesmo. Foi utilizado espectrofotômetro de absorção atômica por chama, para análise quantitativa de cálcio. Para a análise de fósforo foi utilizado espectrofotômetro de absorção molecular em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).

Os fêmures, após serem submetidos ao ensaio de flexão, foram padronizados em 1,5 cm de comprimento, a partir do trocânter maior, o que possibilitou analisar a região proximal do fêmur, onde existe maior quantidade de osso trabecular e foram recolocados em formaldeído. Os pedaços ósseos foram levados para a Embrapa Pecuária Sudeste, para serem analisados. Para a análise é necessário que os ossos sejam transformados em solução, para isso, seguiram-se algumas etapas:

- Desidratação dos ossos, para retirada de água e formaldeído. Os ossos foram colocados em estufa a 105ºC durante aproximadamente 8 horas.
- Os ossos foram colocados em mufla, para serem calcinados. A temperatura da mufla aumentou gradativamente, até a temperatura de $600^{O}$C, durante 3 horas.
- Após calcinados, os ossos foram macerados em cadinho com pistilo de porcelana. No estudo piloto, todos os ossos do mesmo grupo, após calcinados, foram colocados em um único cadinho, o que impediu a realização de uma análise estatística. No estudo

experimental, em cada cadinho foram colocados dois ossos. Exceto em alguns casos que foi necessário colocar três ossos.

- Nos ossos triturados foi adicionado ácido clorídrico a 37% para solubilizá-los. A amostra foi diluída em 100 ml.
- Foram levados para o espectrofotômetro de absorção atômica após fazer a curva de calibração que utilizou uma solução de cálcio com concentração conhecida.
- A mesma amostra foi utilizada para análise de fósforo.

### 4.4.4. Microscopia de Luz Comum

Utilizaram-se os fêmures direitos das ratas para esta etapa. As peças foram fixadas em formaldeído por pelo menos 24 horas. Depois foram lavadas em água corrente por 24 horas. Foram colocadas em solução descalcificadora de Morse (Citrato de Sódio à 20% e Ácido Fórmico à 50% - partes iguais de cada) até obter a descalcificação da peça (8 a 10 dias trocando a solução de Morse a cada 2 dias). Depois disso, as peças foram lavadas novamente em água corrente por 24 horas.

As peças foram colocadas em sulfato de sódio à 5% para a neutralização do ácido (Morse) durante cinco dias, e foram novamente lavadas em água corrente por 24 horas. Posteriormente, as peças foram desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em álcool xilol, depois xilol, e incluídas em parafina. Foram realizados 7 cortes seriados de 6 µm de espessura, utilizando micrótomo. As lâminas foram coradas em Hematoxilina/Eosina (HE) e tricômico de Masson (TM).

Nesta etapa foram analisados aspectos morfológicos qualitativos do estado ósseo.

### 4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A utilização de MEV tem contribuído muito para o estudo da estrutura da matriz óssea (BOYDE, 1972), uma vez que esta técnica permite analisar estruturas irregulares, como o osso. A análise por MEV possibilita observar as diferenças estruturais entre os grupos experimentais.

Para o preparo das amostras foi utilizada a mesma metodologia para o preparo de lâminas histológicas. Após a realização dos cortes para a histologia de luz comum, foram realizados 2 cortes seriados de 50µm de espessura para análise por MEV. Após a realização dos cortes, estes foram desparafinizados usando banhos de xilol, álcool-xilol, álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70% e finalizando em água destilada. Estas etapas são importantes para retirar elementos não pertencentes aos ossos e assim permitir analisá-los sem quaisquer interferências externas. Os cortes foram secos em estufa a 58° C e colados sobre fita de carbono dupla face no suporte utilizado para a realização da análise. Os cortes foram metalizados com ouro para facilitar a condutibilidade elétrica. Foi utilizado um equipamento LEO modelo 440, realizado no Departamento de Química/EESC-USP.

### 4.4.6. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a uma análise estatística, sendo utilizados níveis de significância de 5%.

Para comparar as diferenças de massas corpóreas das ratas dos distintos grupos no início e no final do experimento foi aplicado o teste T. Para comparar as variáveis mecânicas e a quantidade de material mineral ósseo (cálcio e fósforo) entre os grupos estudados foi aplicada a análise de variância (ANOVA).

# 5. RESULTADOS

## 5.1. Estudo Piloto

### 5.1.1. Massa corpórea

A tabela 2 mostra os valores corpóreos médios e desvios padrões (DP) das ratas dos grupos controle e ovarectomizado no início e no final do experimento. Observam-se diferenças estatisticamente significativas no ganho de massa corpórea entre os dois grupos (p = 0,000000008), sendo maior nas ratas pertencentes ao grupo ovarectomizado.

**TABELA 2. Valores médios e DP das massas corpóreas dos dois grupos experimentais do estudo piloto.**

| Grupos | N | Massa inicial | Massa final |
|---|---|---|---|
| Controle | 5 | 196 ± 5.47 | 244 ± 8,94 |
| Ovarectomizado | 6 | 195 ± 5.47 | 300 ± 8,94 |

*p<0,05

### 5.1.2. Ensaio Mecânico

O teste mecânico permitiu a construção de gráficos carga *versus* deformação dos fêmures das ratas pertencentes aos dois grupos experimentais do estudo piloto (Figuras 12 e 13) e, a partir deles, comparar os valores das propriedades mecânicas dos ossos entre os grupos (Figura 14). A tabela 3 mostra os valores médios e DP das diferentes propriedades mecânicas analisadas.

Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (carga máxima p=0.278; deformação máxima p=0.168; rigidez p=0.344; resiliência

p=0.763; tenacidade p=0.59) quando relacionadas as variáveis mecânicas e os grupos estudados.

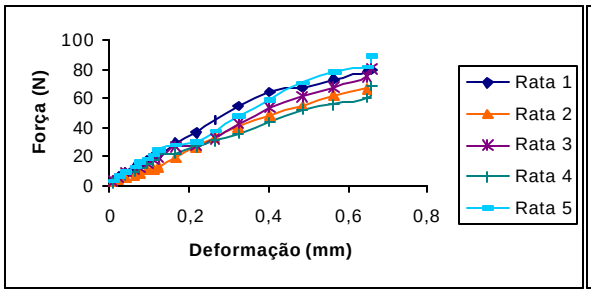



**FIGURA 12. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo controle.**

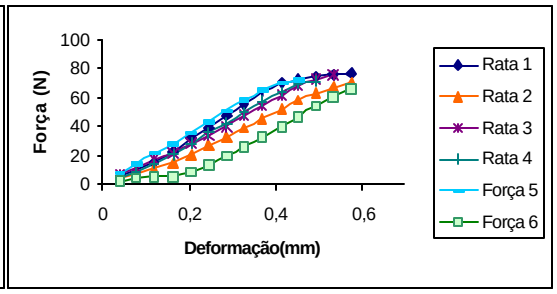



**FIGURA 13. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo ovarectomizada.**

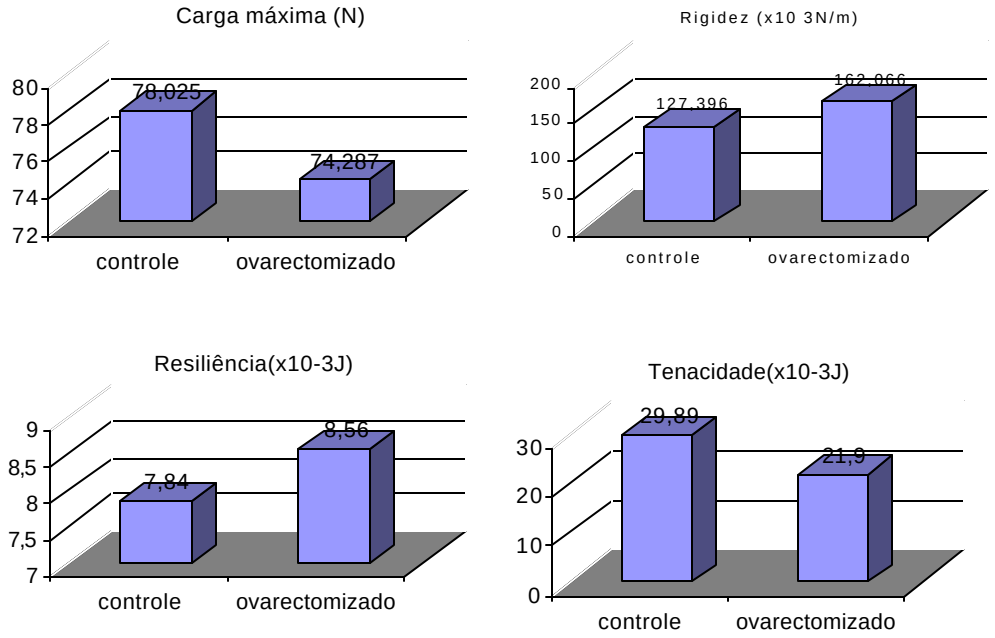



**FIGURA 14. Comparação entre os diferentes grupos do estudo piloto para cada propriedade mecânica. Não existem diferenças estatisticamente significativas quando relacionadas as variáveis mecânicas aos grupos estudados.**

**TABELA 3. Propriedades mecânicas dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais (média ± DP).**

| Grupo | N | Carga Máxima (N) | Deformação máxima ($x10^{-3}$m) | Rigidez ($x\ 10^{3}$N/m) | Resiliência ($x10^{-3}$J) | Tenacidade ($x10^{-3}$J) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Controle | 5 | 78.025 ± 8.804 | 0.671 ± 0.123 | 127.39 ± 54.01 | 7.84 ± 4.390 | 29.8 ± 8.24 |
| Ovarectomizado | 6 | 74.28 ± 2.004 | 0.572 ± 0.097 | 162.06 ± 22.49 | 8.566 ± 3.37 | 21.9 ± 3.60 |

### 5.1.3. Análise Quantitativa de Cálcio/Fósforo.

Através da análise quantitativa de cálcio e fósforo dos fêmures dos animais submetidos ao experimento piloto, pode-se observar que as ratas do grupo controle (aquelas que não foram submetidas à cirurgia de ovarectomia) apresentaram maior quantidade de cálcio e fósforo (médias: 180,59 g/kg de cálcio; 90 g/kg de fósforo) quando comparados com o grupo de ratas ovarectomizadas (médias: 140,94 g/kg de cálcio e 73,49 g/kg de fósforo). Ocorreu diminuição de 21, 956% de cálcio e 18, 34% de fósforo nas ratas ovarectomizadas comparada com as do grupo controle (Figura 15).

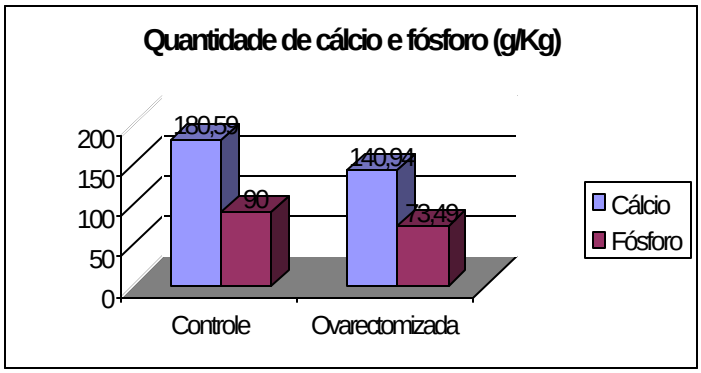



**FIGURA 15: Quantidades de cálcio e fósforo em g/kg dos grupos controle e ovarectomizado.**

Portanto, foi possível confirmar que o protocolo de ovarectomia é eficaz para a indução de osteopenia em um período de 30 dias. Devido ao fato das ratas utilizadas serem isogênicas, pode-se esperar que os resultados obtidos no procedimento piloto, em relação à indução de osteopenia, também se repitam nos grupos de ratas ovarectomizadas, as quais foram tratadas com ultra-som de baixa intensidade.

### 5.1.4. Microscopia de Luz Comum

Através da microscopia de luz comum é possível observar as células ósseas existentes em um determinado corte histológico. A análise histológica do estudo piloto mostrou que o grupo de ratas ovarectomizadas apresentou discreto aumento da atividade osteoblástica comparada com o grupo controle.

Pode-se observar no grupo de ratas ovarectomizadas uma grande quantidade de osteoblastos ao redor de trabéculas ósseas, que aparentam estar ativos pelo maior contato entre eles e a matriz óssea (Figura 16).

No grupo controle, observa-se menor quantidade de osteoblastos, com trabéculas livres de atividade osteoblástica (Figura 17). A figura 18 indica a medula óssea com um possível vaso sangüíneo e hemácias imaturas ao seu redor.

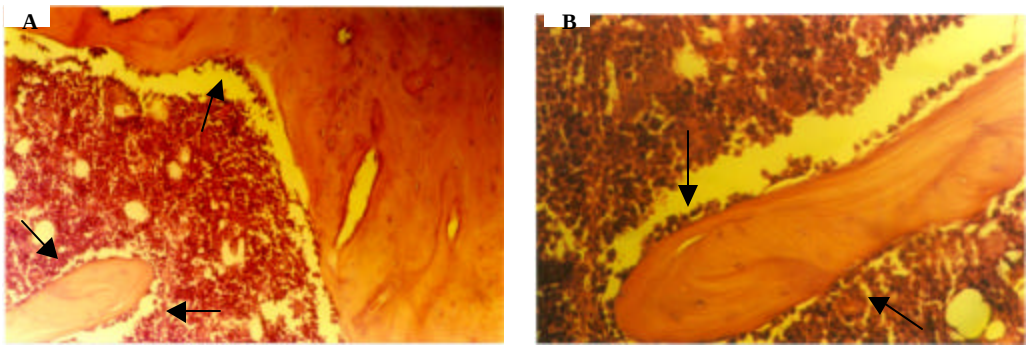



**FIGURA 16. Fotomiografias de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas ovarectomizadas, após 30 dias de cirurgia. As setas indicam células osteoblásticas em contato com trabécula óssea. Coloração HE. Corte longitudinal. A) Aumento de 160 x; B) Aumento de 320 x.**

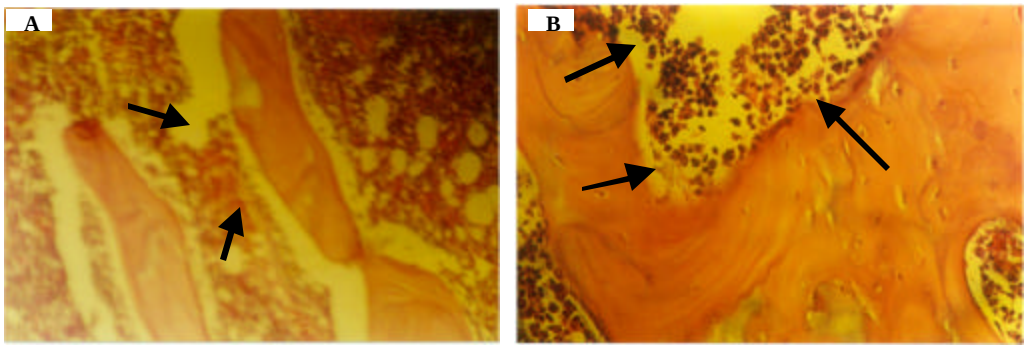



**FIGURA 17. Fotomiografias de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo controle. As setas indicam células osteoblásticas com menor contato com trabécula óssea, caracterizando uma menor ativação da formação óssea. Coloração HE. Corte longitudinal. A) Aumento de 160 x; B) Aumento de 320 x.**

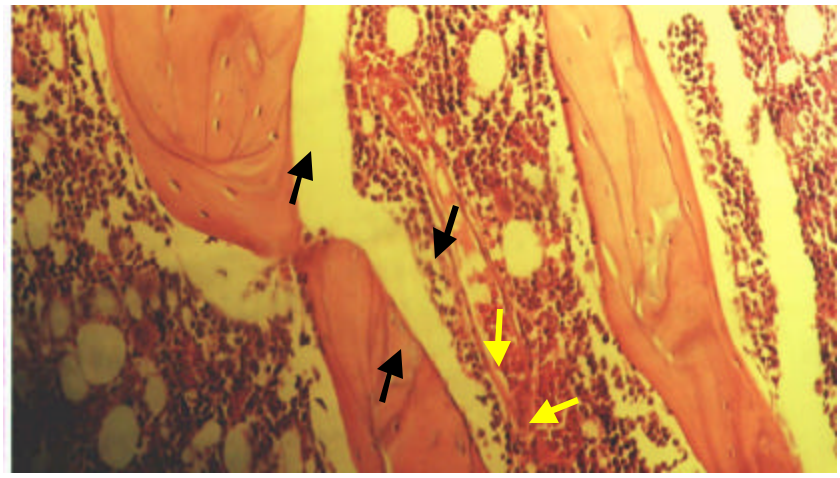


**FIGURA 18. Fotomiografias de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo controle. As setas pretas apontam uma região bem delimitada preenchida por hemácias, indicando ser um vaso sanguíneo. As setas amarelas mostram hemácias imaturas, ao redor do vaso sangüíneo. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 160x.**

### 5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através do MEV foi possível comparar as diferenças estruturais dos fêmures das ratas dos grupos controle e ovarectomizado. A figura 19 e a figura 20 mostram as diferenças, entre os grupos, da estrutura trabecular dos fêmures das ratas. Através de comparação, é possível observar que as trabéculas ósseas existentes no fêmur de rata ovarectomizada estão mais espaçadas e com suas conectividades reduzidas.

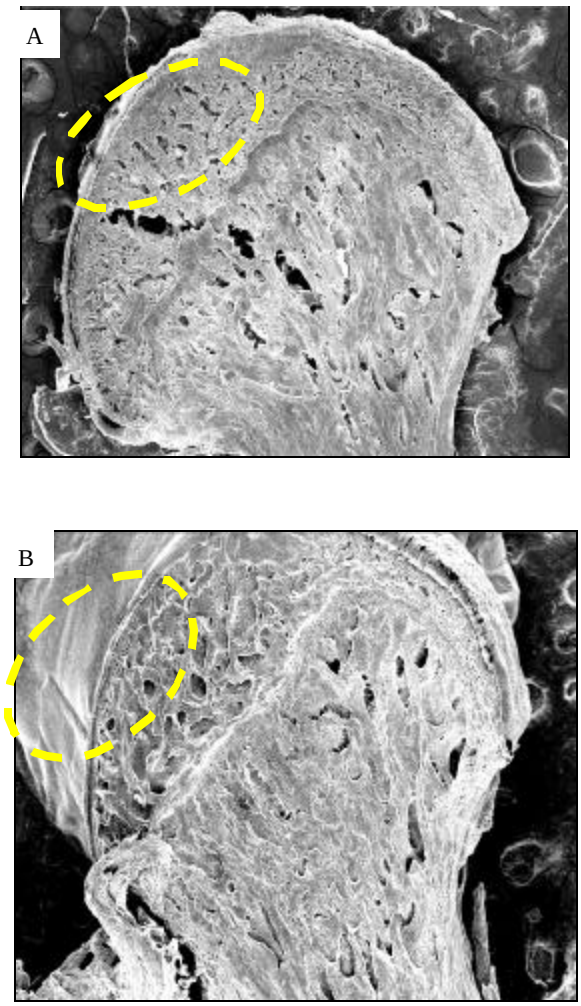



**FIGURA 19. A) Microscopia eletrônica de varrredura da cabeça femural de rata controle; B) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata ovarectomizada. Elipses indicam diferenças estruturais entre os grupos. Observam-se poros mais profundos e de maiores dimensões no grupo ovarectomizado comparado com grupo controle. Aumento de 100x.**

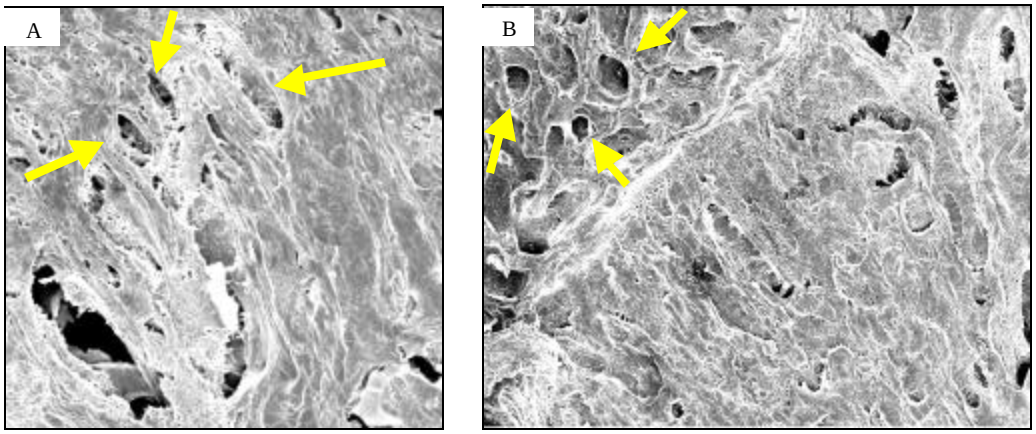



**FIGURA 20. A) Microscopia eletrônica de varrredura da cabeça femural de rata controle; B) Microscopia eletrônica de varrredura da cabeça femural de rata ovarectomizada. As setas apontam porosidade óssea. Observam-se poros maiores e mais profundos na região trabecular do osso de rata ovarectomizada. Aumento de 200x.**

### 5.2. Tratamentos

#### 5.2.1. Massa Corpórea

A tabela 4 mostra os valores massas corpóreas médios e DP das ratas dos grupos placebo e tratado no início e no final do experimento. Observam-se diferenças estatisticamente significativas (p = 0.005) no ganho de massa corpórea entre os dois grupos, sendo maior nas ratas pertencentes ao grupo placebo.

**TABELA 4. Valores médios e DP das medidas corpóreas dos dois grupos experimentais.**

| Grupos | N | Peso inicial | Peso final |
|---|---|---|---|
| Placebo | 9 | 188.8 ± 7.81 | 306.6 ± 14,14 |
| Tratado | 25 | 195.2 ± 11.2 | 286.4 ± 25.47 |

*p<0,05

### 5.2.2. Ensaio Mecânico

Através do ensaio de flexão foi possível construir gráficos de carga *versus* deformação (figuras 21 e 22) e, assim, obter e comparar os valores das propriedades mecânicas dos ossos de diferentes grupos experimentais (Figura 23). A Tabela 5 mostra os valores médios e os DP das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais: placebo e tratado. Observa-se que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas quando relacionadas as variáveis mecânicas e os grupos estudados (carga máxima p=0,5603; deformação máxima p=0.1551; rigidez p=0.0546; resiliência p=0.5835; tenacidade p=0.2926).

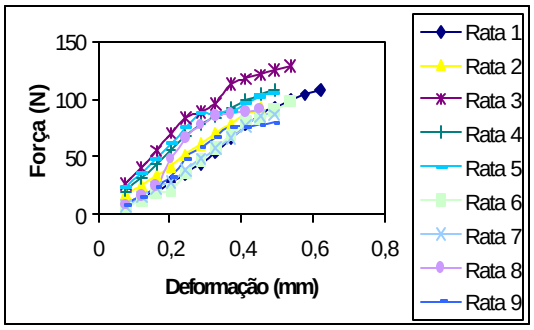



**FIGURA 21. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo placebo.**

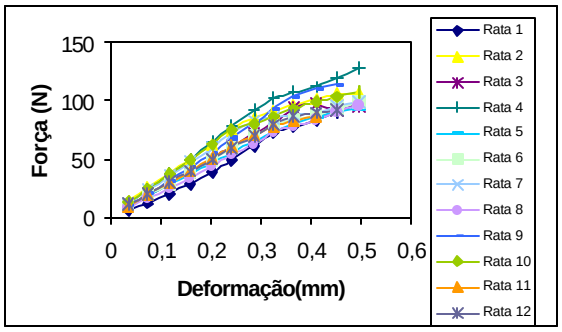



**FIGURA 22. Gráfico FxD dos fêmures das ratas do grupo tratado.**

**TABELA 5. Propriedades mecânicas dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais (média ± DP).**

| Grupo | N | Carga Máxima (N) | Deformação máxima ($x10^{-3}$m) | Rigidez ($x\ 10^{3}$N/m) | Resiliência ($x10^{-3}$J) | Tenacidade ($x10^{-3}$J) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Placebo | 9 | 99.78 ± 14.69 | 0,597 ± 0.108 | 205.3 ± 79.89 | 11.1 ± 4.77 | 34.0 ± 7.35 |
| Tratado | 12 | 103.280 ± 12.33 | 0.509 ± 0.05 | 258.3 ± 33.85 | 10.9 ± 3.25 | 30.7 ± 6.63 |

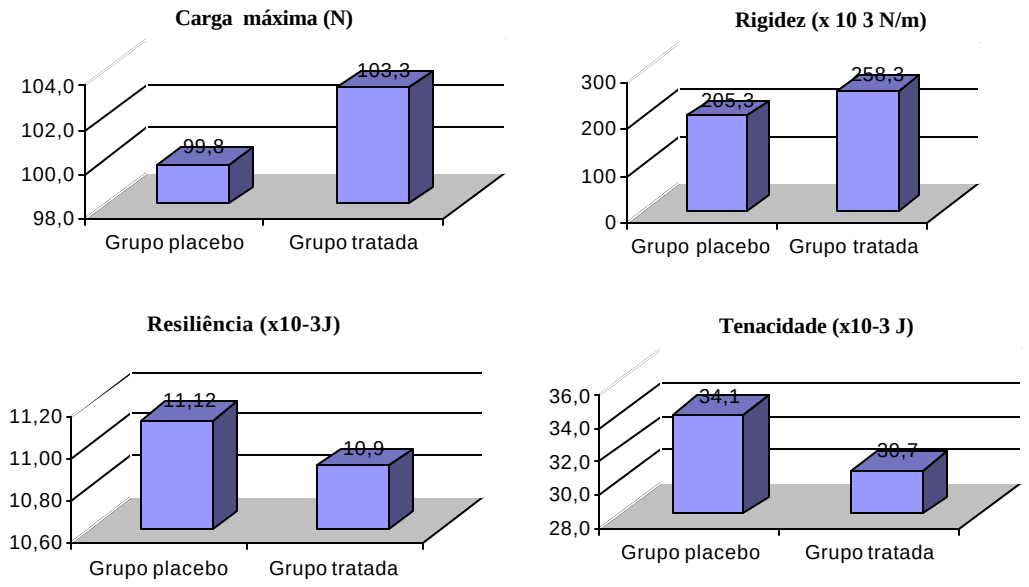



**FIGURA 23. Comparação entre os diferentes grupos experimentais para cada propriedade mecânica. Não existem diferenças estatisticamente significativas para todas as propriedades analisadas.**

### 5.2.3. Análise Quantitativa de Cálcio/Fósforo

A tabela 6 mostra os valores de cálcio e fósforo dos dois grupos experimentais.

**TABELA 6. Valores médios e DP das quantidades de cálcio e fósforo dos fêmures das ratas dos dois grupos experimentais.**

| Grupo | Número de cadinhos | Cálcio (g/kg) | Fósforo (g/kg) |
|---|---|---|---|
| Placebo | 6 | 355.74 | 148.065 ± |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | ±112.47 | 24.50 |
| Tratado | 14 | 334.15 ±128.51 | 133.26 ± 38.20 |

* não significativo

As análises quantitativas de cálcio e fósforo realizadas mostraram que o grupo de ratas ovarectomizadas submetidas ao tratamento de ultra-som de baixa intensidade alcançaram valores não estatisticamente significativos comparado com os valores obtidos nas ratas do grupo placebo (p = 0.734 para cálcio; p = 0.396 para fósforo) (Figura 24).

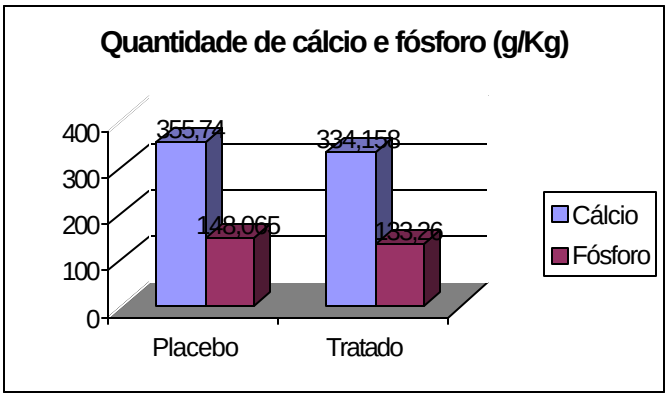



**FIGURA 24. Quantidades de fósforo e cálcio em g/kg. Grupo placebo: ratas não ovarectomizadas e sem tratamento; Grupo tratado: ratas ovarectomizadas e submetidas ao tratamento ultra-sônico.**

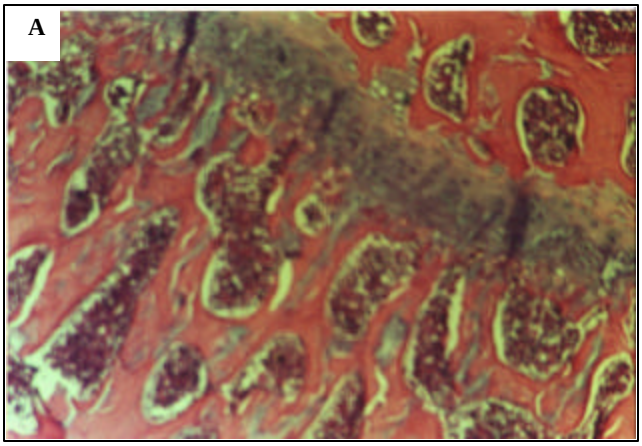
### 5.2.4. Microscopia de Luz Comum

Os achados das análises histológicas dos fêmures do grupo placebo indicam uma menor concentração de osteoblastos na matriz óssea e uma menor interação das células osteoblásticas com as trabéculas ósseas comparado com o grupo tratado (Figura 26). Este menor contato entre as células com o osso indica reduzida atividade osteoblástica. Estas diferenças comparativas não são possíveis de serem observadas

em um menor aumento (Figura 25). A figura 27 mostra a existência de hemácias imaturas próximas aos osteoblastos.

As figuras 28-AB e 28-CD comparam a região da cabeça femural entre o grupo placebo e tratado. A coloração com tricrômico de Masson possibilita estudar a idade óssea, sendo que ossos maduros se coram em azul e os ossos imaturos se coram em vermelho. É possível observar que, no grupo placebo a matriz óssea é predominantemente formada por osso maduro, não indicando formação óssea recente. No grupo tratado, observam-se regiões com neoformação óssea, o que indica osteoblastos ativos.

O aumento da atividade osteoblástica foi subjetivamente observado, não se utilizando métodos morfométricos.



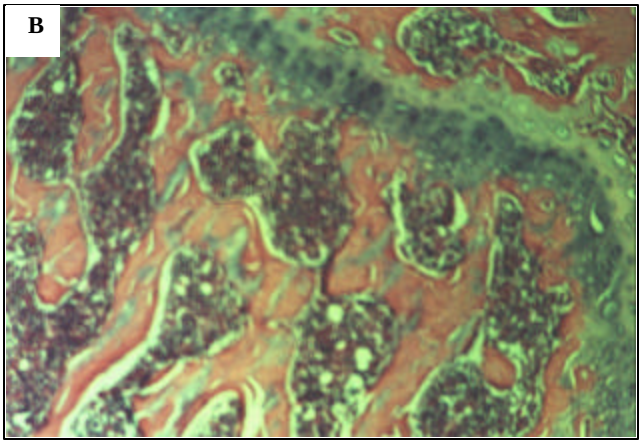



**FIGURA 25. A) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas placebo. B) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas tratado. Neste aumento não é possível observar diferenças entre os grupos. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 80 x.**

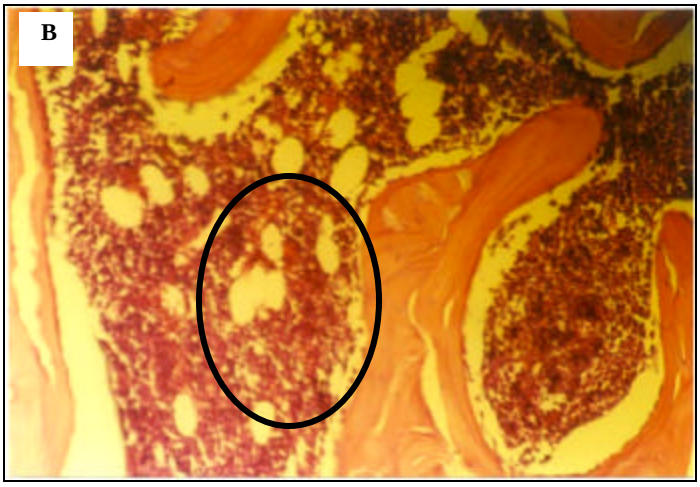



**FIGURA 26. A) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas placebo. B) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de**

**ratas tratado. Elipses indicam regiões com concentrações de osteoblastos. Observa-se no grupo placebo células osteoblásticas em menor quantidade e com menor interação entre elas e as trabéculas ósseas. Coloração HE. Corte longitudinal. A) Aumento de 160 x.**

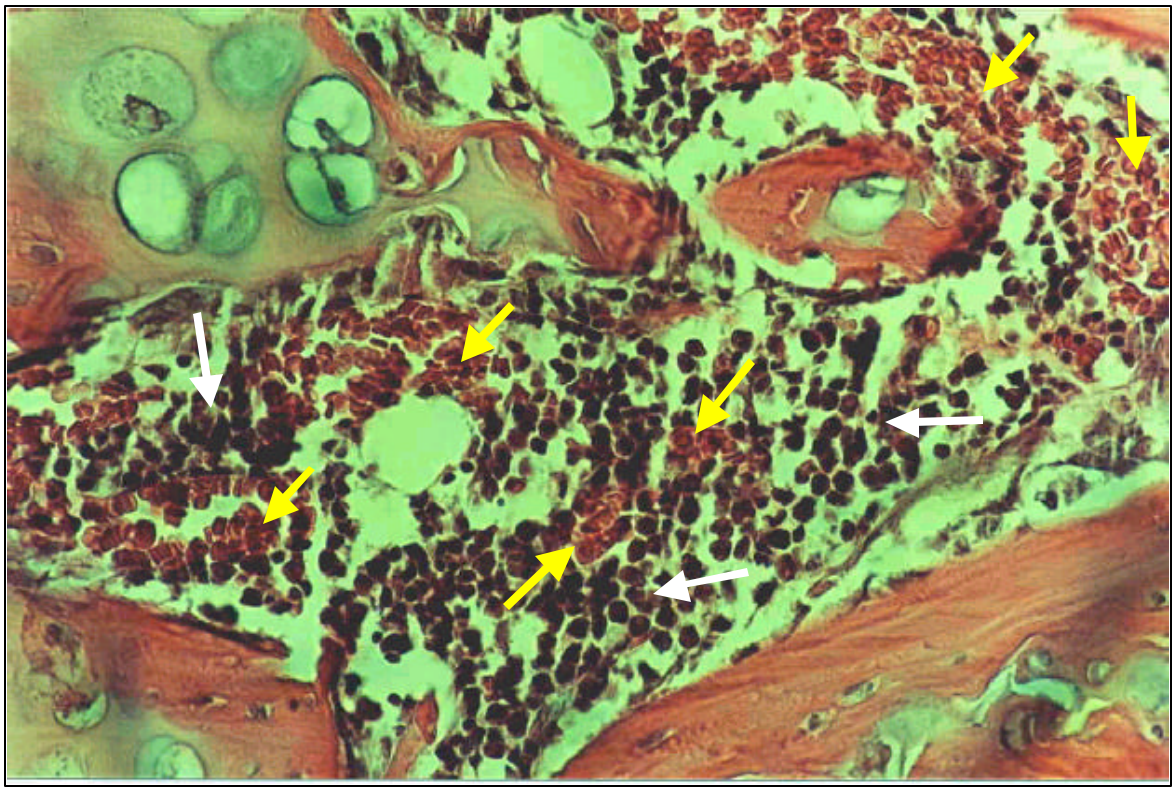


**FIGURA 27. Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de rata do grupo tratado. Setas brancas indicam: Osteoblastos; Setas amarelas indicam: Hemácias. Corte longitudinal. Coloração HE. Aumento de 320x.**

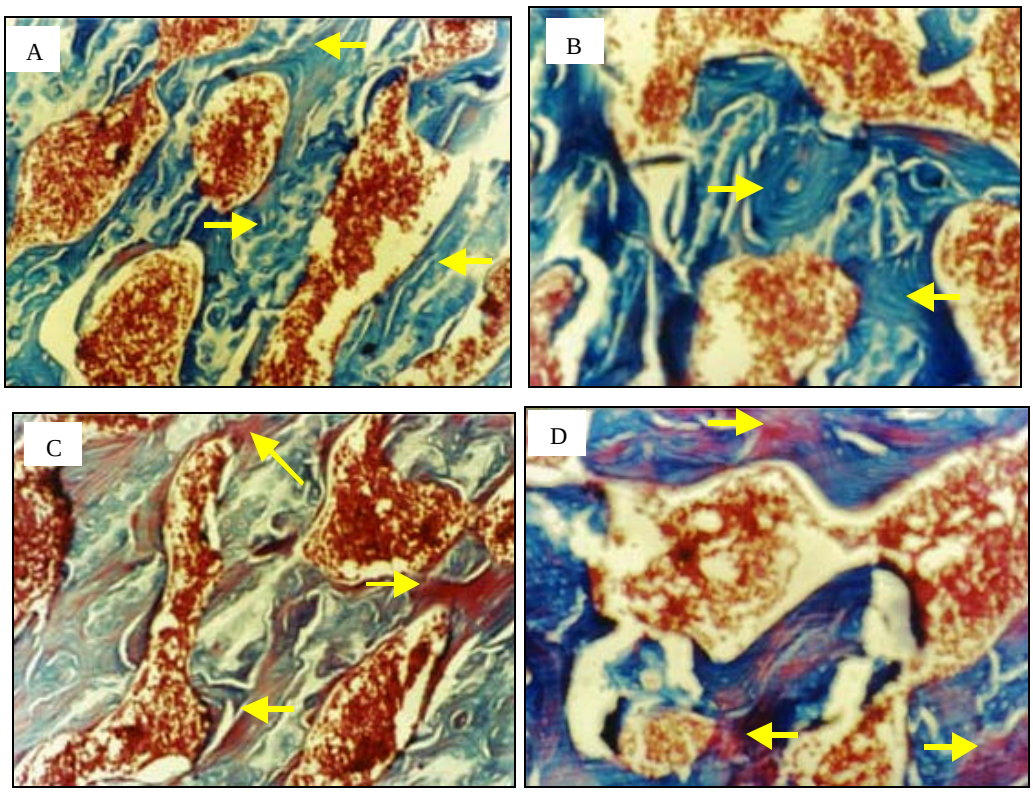
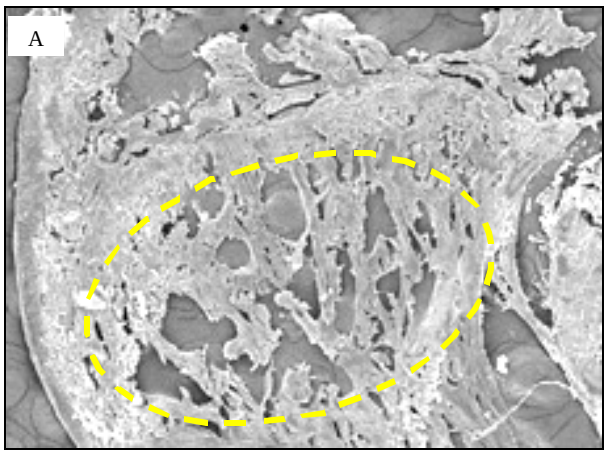



**FIGURA 28. A-B) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo placebo; setas indicam matriz óssea formada por osso maduro (trabéculas totalmente coradas em azul); C-D) Fotomiografia de tecido ósseo da região proximal do fêmur de ratas do grupo tratado; as setas indicam neoformação óssea (regiões trabeculares coradas em vermelho). Corte longitudinal. Coloração TM. Aumento de 160x.**

### 5.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV mostram as diferenças estruturais da região da cabeça femural entre os grupos placebo e tratado. As figuras 29 e 30 comparam os fêmures de ratas do grupo placebo com os fêmures do grupo tratado em aumentos diferentes. É possível observar diferenças estruturais entre os grupos, com maior perda de osso trabecular no grupo placebo. A figura 31 mostra uma imagem

ampliada da região superior da cabeça femural de rata tratada. Observa-se a microarquitetura trabecular com suas conectividades. A figura 32 indica regiões com medula óssea tanto no grupo placebo quanto no grupo tratado.



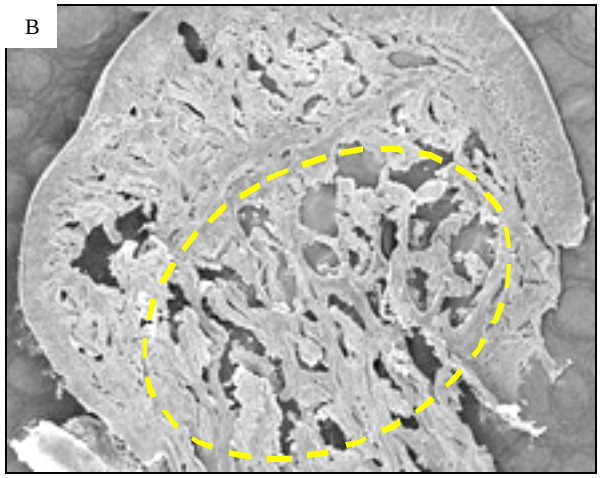




**FIGURA 29. A) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata do grupo placebo; B) Foto da cabeça femural do grupo tratado. Elipses indicam a diferença estrutural entre os grupos. Pode-se observar, no grupo placebo, trabeculado ósseo mais separados. Aumento 100x.**

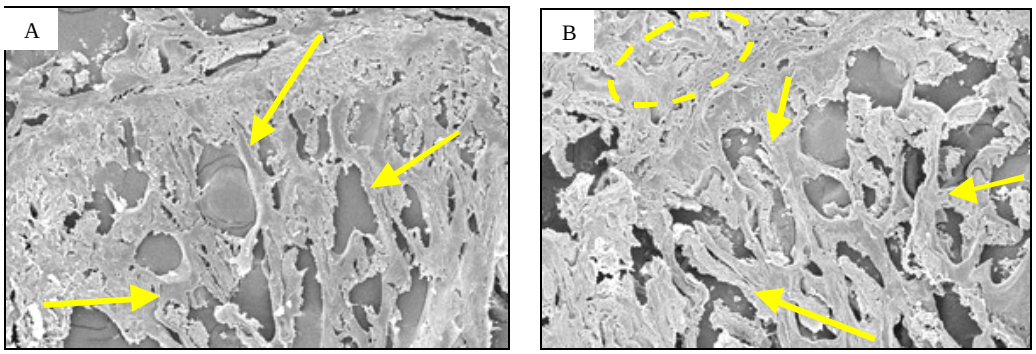



**FIGURA 30. A) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo placebo. As setas indicam maior destruição da microarquitetura óssea comparado com o grupo tratado; B) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo tratado. Aumento 200x.**

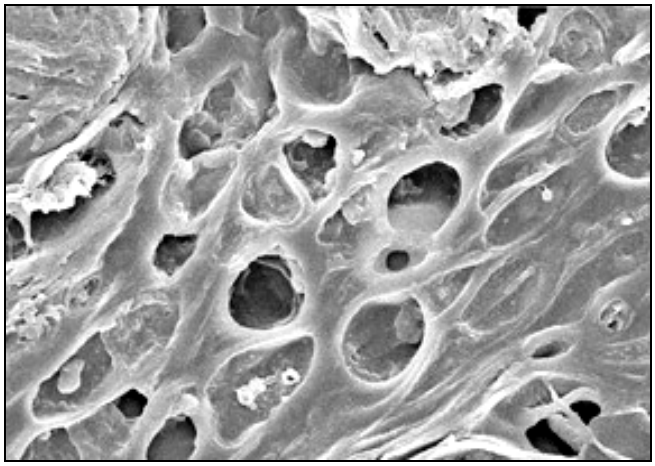
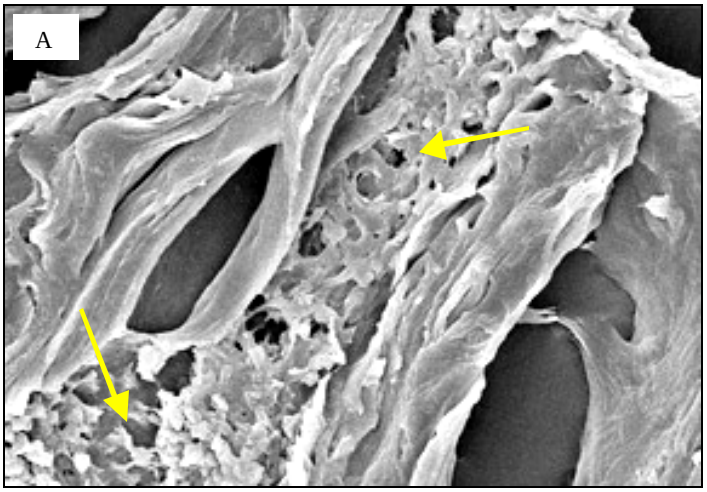


**FIGURA 31. Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata do grupo tratado. Detalhe da estrutura trabecular da região circundada pela elipse da Fig 28-B. Aumento de 2000x.**



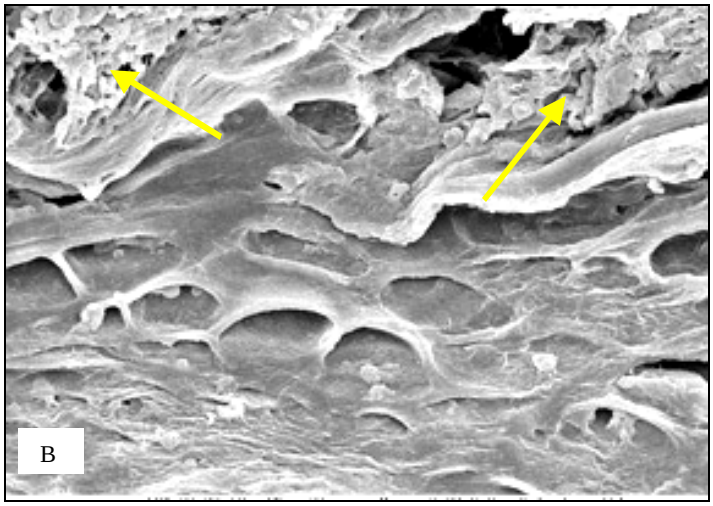




**FIGURA 32. A) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo placebo; B) Microscopia eletrônica de varredura da cabeça femural de rata grupo tratado. Setas indicam medula óssea vermelha ao redor de trabéculas ósseas. Aumento de 2000x.**

## 6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm utilizado modelo de rata castrada para indução de osteopenia e através disso estudar as causas e mecanismos da osteoporose, bem como métodos eficazes para seu tratamento (KALU, 1991; THOMPSON, 1995). A rata ovarectomizada é um modelo útil devido ao fato de apresentar mecanismos biológicos similares aqueles ocorridos em mulheres osteoporóticas (FROST & JEE, 1992, KALU, 1991).

Baseado na literatura, foi utilizado ratas osteopênicas isogênicas para estudar os efeitos do ultra-som de baixa intensidade na estrutura óssea destes animais. O ultra-som de baixa intensidade tem mostrado efeito positivo, tanto em estudos experimentais como em clínicos, sobre a aceleração e estimulação da osteogênese em situações como pseudoartrose e em retardo de consolidação de fraturas, e mesmo em fraturas recentes (DUARTE, 1983; XAVIER & DUARTE, 1983; DYSON & BROOKES, 1983; COLOMBO, 1992). Estudos também já mostraram que o ultra-som é eficaz na cura de fraturas em pacientes que possuem patologias que interferem na recuperação óssea como a osteoporose (FRANKEL, 1998; MAYR et al, 2000).

No entanto, não existem muitos estudos relatando o efeito do ultra-som de baixa intensidade em casos de osteoporose sem a ocorrência de fraturas. FRANKEL (1998) e MAYR et al (2000) em seus estudos observaram resultados positivos do tratamento com ultra-som em pacientes osteoporóticos com fraturas recentes, com retardo de consolidação ou não-união óssea.

O estudo piloto realizado previamente ao início do estudo experimental possibilitou analisar as mudanças acompanhadas pela perda óssea induzida pela deficiência de estrógeno, após 30 dias de ovarectomia. Os resultados quantitativos, após este período de tempo, mostraram uma diminuição acentuada da matriz mineral, com redução de 21,956% de cálcio e 18, 34% de fósforo nas ratas ovarectomizadas comparada com as do grupo controle.

Através da análise por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar diferenças estruturais entre os fêmures dos grupos controle e ovarectomizado do estudo piloto. No grupo ovarectomizado, as trabéculas ósseas estão mais separadas e suas conectividades reduzidas, caracterizando uma maior reabsorção óssea pelos osteoclastos nas placas trabeculares comparado com o grupo de ratas normais. Estes achados roboram os estudos que também observaram perda óssea trabecular em conseqüência da carência de hormônio ovariano (DEVLIN et al, 1990; DEMPSTER et al, 1995; THOMPSON et al, 1995; CANOTILHO, 1996).

DEMPSTER et al (1995) sugeriram que após ovarectomia ocorre rápida perfuração das trabéculas ósseas pelos osteoclastos, seguido de sua completa remoção, o que aumenta os espaços existente entre elas. Estas alterações na estrutura trabecular também foram observadas em mulheres pós-menopausais (DEMPSTER & LINDSAY, 1993).

As análises histológicas do estudo piloto mostraram que o grupo de ratas ovarectomizadas comparada com o grupo controle apresentou discreto aumento da atividade osteoblástica caracterizada por uma maior concentração de osteoblastos ao redor das trabéculas, o que aparenta uma maior interação das células ósseas com o osso. Estes achados provavelmente se devem ao fato de uma maior razão de formação óssea nas ratas ovarectomizadas que ocorrem na tentativa de reverter o aumento da perda de osso, corroborando os achados de TANIZAWA et al (2000) que observaram aumento da razão de formação óssea causada pela ovarectomia nos primeiros 30 dias pós-cirurgia, voltando a normalidade após este período.

A existência de hemácias fora de vasos sangüíneos é evidência de atividade de células hematopoiéticas, o que indica existir medula óssea ativa. Assim, nos espaços trabeculares, juntamente com células osteoblásticas, encontra-se a medula óssea vermelha. Quando a medula óssea está inativa, a formação de células sangüíneas se cessa e a região medular adquire característica de tecido adiposo, denominada de medula óssea amarela (ROSS et al, 1995).

Estes resultados juntos possibilitaram comprovar a eficácia do protocolo cirúrgico utilizado, corroborando os relatos da literatura os quais demonstraram que trinta dias após ovarectomia são suficientes para indução de osteopenia em ratas maduras (DEVLIN et al, 1990; THOMPSON et al, 1995). Estes estudos observaram

diminuição óssea e aumento da reabsorção óssea, o que torna o osso mais fino e com menor quantidades de trabéculas individuais.

As ratas ovarectomizadas do estudo piloto também apresentaram ganho de massa corpórea estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) concordando com os relatos da literatura que demonstraram que a ovarectomia provoca alterações metabólicas responsáveis pelo aumento pronunciado da ingestão alimentar e massa corpórea (DANIELSEN et al, 1993; WRONSKI, 1987). O ganho de massa corpórea é maior em ratas ovarectomizadas comparado com ratas intactas mesmo em condições similares de ingestão alimentar (DANIELSEN et al, 1993, KALU, 1989).

THOMPSON et al (1995) em um estudo a longo prazo, utilizando DEXA, observaram maior ganho de massa corpórea nas ratas ovarectomizadas comparado com ratas controles em conseqüência do aumento de gordura corpórea e não pelo aumento de massa magra, a qual estava levemente reduzida nas ratas ovarectomizadas.

Os resultados do ensaio de flexão dos grupos controle e ovarectomizado do estudo piloto não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando relacionadas as variáveis mecânicas aos grupos estudados ($p>0,05$). Estes resultados corroboram o estudo de POHLMAN et al (1985) que observaram, ao avaliar a força da diáfise femural através de ensaio mecânico, que as ratas embora osteopênicas não apresentaram diferenças significativas na força máxima da região cortical quando comparadas com grupo controle.

Embora para testar as propriedades mecânicas do fêmur o FDA -Food and Drug Administration - indique o ensaio de flexão para a região cortical (MOSEKILDE et al, 1998), nossos resultados observaram que este tipo de ensaio talvez não seja o ideal para analisar alterações ocorridas nas propriedades mecânicas seguido a ovarectomia, pois a região óssea testada, neste caso, é predominantemente constituída por osso cortical (diáfise femural).

Estudos mostraram que diferentes regiões ósseas respondem a ovarectomia de formas diferentes, sendo que regiões com predominância de osso cortical não sofrem alterações significativas por serem menos sensíveis à queda do hormônio ovariano (MOSEKILDE et al, 1998; MOSEKILDE et al, 1994; SOGAARD et al, 1994). Com

a ovarectomia se observa perda significativa de conteúdo mineral principalmente no osso trabecular (KALU, 1991). Portanto, não havendo perda de osso cortical de forma acentuada, não ocorrem alterações nas propriedades mecânicas do osso na região da diáfise femural.

MOYLE et al (1986) observaram, através de ensaio de compressão em fêmures de ganso, que a diminuição da resistência à ruptura dos ossos ocorre por deficiência de cálcio. CHAKKALAKAL et al (1990) observaram, através de ensaio de flexão de três apoios em calo ósseo formado em rádios osteotomizados de cães, que a rigidez óssea está relacionada com a quantidade de material mineral existente, sendo que baixa rigidez é causada pela deficiência de mineral. Portanto, ensaio mecânico da região do colo femural provavelmente verificaria diferenças entre os grupos controle e ovarectomizado, uma vez que esta região contém grande quantidade de osso trabecular (BOHR & SCHAADT, 1985; MUNDY, 1999). PENG et al, 1994 observaram diminuição pronunciada da força óssea, no colo femural, após ovarectomia.

Segundo COWIN (1989) os ensaios mecânicos são confiáveis mas podem ser afetados de diversas formas, principalmente quando aplicados a materiais biológicos como o osso, pois estes apresentam diferenças em seus tamanhos e em sua forma de responder a forças de diferentes velocidades e direções. Portanto, os materiais ideais para serem submetidos a ensaios de flexão são aqueles homogêneos, que se comportam da mesma maneira para qualquer orientação de força.

Após analisar as alterações provocadas pela carência de hormônio ovariano nos fêmures de ratas maduras, foi possível iniciar o estudo experimental.

Os resultados mostraram ganho de massa corpórea estatisticamente significativo no grupo experimental placebo ($p = 0,005$) quando comparado com o grupo tratado, o que estabelece uma correlação entre o ultra-som e um menor ganho de massa corpórea. No entanto, não foram encontrados na literatura trabalhos relacionando o ultra-som a massa corpórea em animais ovarectomizados.

Assim como no estudo piloto, os ossos do grupo placebo comparados com os do grupo tratado, embora ovarectomizados não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$) quando relacionadas as variáveis mecânicas aos grupos estudados. O ultra-som talvez não tenha estimulado o aumento do conteúdo mineral

ósseo e, consequentemente, da resistência óssea na diáfise femural pela falta de alterações no metabolismo ósseo desta região, o que a torna menos sensível ao estímulo ultra-sônico.

Os resultados quantitativos do conteúdo mineral não demonstraram um aumento significativo de cálcio e fósforo nos ossos osteopênicos de ratas tratadas com ultra-som de baixa intensidade comparado com ossos de ratas não tratadas.

O conteúdo mineral é um indicativo indireto do estágio da mineralização óssea e, portanto, um baixo conteúdo ósseo mineral pode indicar uma grande quantidade de tecido neosintetizado e ainda não totalmente mineralizado. (COWIN, 1989; HADJIDAKIS et al, 1993). AMPRINO & ENGSTRON (1952) citado por ARNOLD (1966) foram os primeiros a mostrar, através de microradiografias, que o tecido neoformado não é inteiramente mineralizado, contendo de 60% a 85% do material mineral contido em ossos maduros. O osso recém sintetizado continua o processo de mineralizacão até que este se complete.

Embora esta análise quantitativa não tenha mostrado diferenças estatisticamente significativas ($p>0.05$) ao comparar os grupos experimentais, os achados qualitativos apontaram diferenças estruturais entre os grupos.

A análise histológica (coloração hematoxilina/eosina) indicou aparente aumento da atividade osteoblástica, constatado pela proximidade das células ósseas com as trabéculas, no grupo de ratas tratadas. No grupo de ratas placebo se observou osteoblastos em menor interação com a matriz óssea. Nos espaços dos ossos trabeculares foi possível visualizar hemácias imaturas juntamente com osteoblastos, indicando a existência de células hematopoiéticas ativas.

Quando os cortes foram corados por tricrômico de Masson foi possível observar que o grupo tratado apresentou neoformação óssea, a qual não foi observada no grupo placebo.

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se notar que, no grupo tratado com ultra-som de baixa intensidade, a microarquitetura óssea aparenta estar mais preservada que a do grupo sem tratamento com uma menor perda de trabeculado ósseo, o que torna seu aspecto mais denso.

Através dos resultados quantitativos e qualitativos obtidos pode-se presumir que o tratamento com ultra-som de baixa intensidade em ossos osteopênicos

propiciou uma melhora do trabeculado ósseo. Os resultados qualitativos mostraram uma discreta melhora da arquitetura dos ossos submetidos ao tratamento. No entanto, este aumento e/ou preservação do conteúdo mineral não foi observado de forma quantitativa. Assim, pode-se supor que a análise quantitativa não tenha apontado diferenças devido ao fato de existir grande quantidade de tecido neoformado, o qual ainda não está totalmente mineralizado. A neoformação óssea pôde ser observada através da análise por microscopia de luz comum utilizando tricrômico de Masson como corante. Talvez a duração do tratamento com ultra-som de baixa intensidade não tenha sido suficiente para possibilitar a total mineralização das regiões estimuladas, não possibilitando observar o ínicio da osteogênese por análise da quantia mineral.

ARAI et al (1993) observaram melhora da densidade mineral do colo femural em pacientes osteoporóticos sem fraturas ósseas, com aplicação de ultra-som de baixa intensidade durante 4 semanas por 20 minutos diários.

Através destes resultados pode-se supor que o ultra-som de baixa intensidade é eficaz em situações em que existe alguma patologia óssea e não só em casos de fratura, discordando de SPADARO & ALBANESE (1998) que, por não observar efeito do ultra-som sobre o crescimento de ossos longos de ratos sadios, hipotetizaram que o ultra-som de baixa intensidade promove resultados positivos em casos em que existe fratura óssea, e com menor chance de sucesso em casos que não há fraturas ou traumas ósseos.

Estudos futuros poderiam ser realizados para complementar os achados deste trabalho, como estudar o efeito do ultra-som em ossos osteopênicos por um período maior de tempo e analisar as propriedades mecânicas da região proximal do fêmur após o tratamento.

## 7. CONCLUSÕES

- Estudo piloto comprovou a eficácia de 30 dias após ovarectomia para indução de osteopenia.
- Propriedades mecânicas da diáfise femural não se alteraram nos ossos osteopênicos comparados com ossos normais, assim como também não se alteraram nos ossos tratados comparados com os não tratados.
- Ossos submetidos ao tratamento não apresentaram aumento estatisticamente significativo de cálcio e fósforo comparado com ossos não tratados.
- Análises dos achados histológicos indicaram diferenças estruturais entre os grupos experimentais com maior preservação de trabéculas e indícios de neoformação óssea no grupo tratado.

# 8. ANEXOS

## 8.1 ANEXO 1 - Estudo Piloto

### 8.1.1. Massa corpórea

#### 8.1.1.1. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo controle no início e final do experimento.

| Rata | Massa inicial | Massa final |
|---|---|---|
| 1 | 200 | 250 |
| 2 | 190 | 230 |
| 3 | 190 | 240 |
| 4 | 200 | 250 |
| 5 | 200 | 250 |

#### 8.1.1.2. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo ovarectomizado no início e final do experimento.

| Rata | Massa inicial | Massa final |
|---|---|---|
| 1 | 200 | 310 |
| 2 | 190 | 300 |
| 3 | 190 | 290 |
| 4 | 200 | 300 |
| 5 | 200 | 310 |
| 6 | 190 | 290 |

### 8.1.2. Propriedades mecânicas

#### 8.1.2.1. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas controle.

| Rata | Carga máxima (N) | Deformação Máxima (mm) | Rigidez (x $10^{3}$ N/m) | Resiliência (x$10^{-3}$ J) | Tenacidade (x$10^{-3}$ J) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 72.765 | 0.469 | 158.6 | 14.8 | 18.3 |
| 2 | 79.448 | 0.662 | 161.3 | 9.1 | 32.4 |
| 3 | 66.973 | 0.742 | 49.6 | 4.66 | 25.01 |
| 4 | 90.336 | 0.694 | 175.07 | 6.8 | 39.1 |
| 5 | 80.605 | 0.792 | 92.41 | 3.84 | 34.67 |

#### 8.1.2.2. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas ovarectomizado.

| Rata | Carga máxima (N) | Deformação Máxima (mm) | Rigidez (x $10^{3}$ N/m) | Resiliência (x$10^{-3}$ J) | Tenacidade (x$10^{-3}$ J) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 77.302 | 0.576 | 188.3 | 8.0 | 25.7 |
| 2 | 73.451 | 0.66 | 151.6 | 9.9 | 25.7 |
| 3 | 75.95 | 0.543 | 123.0 | 2.9 | 20.7 |
| 4 | 71.971 | 0.493 | 165.9 | 7.1 | 18.0 |
| 5 | 72.814 | 0.453 | 170.9 | 12.2 | 17.8 |
| 6 | 74.235 | 0.708 | 172.7 | 11.3 | 23.5 |

## 8.2. Anexo 2 – Estudo Experimental

### 8.2.1. Massa corpórea

#### 8.2.1.1. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo placebo no início e final do experimento.

| Rata | Massa inicial | Massa final |
|---|---|---|
| 1 | 200 | 310 |
| 2 | 200 | 300 |
| 3 | 180 | 300 |
| 4 | 190 | 290 |
| 5 | 190 | 300 |
| 6 | 180 | 300 |
| 7 | 180 | 300 |
| 8 | 190 | 330 |
| 9 | 190 | 330 |

#### 8.2.1.2. Tabela das massas corpóreas das ratas do grupo tratado no início e final do experimento.

| Rata | Massa inicial | Massa final |
|---|---|---|
| 1 | 190 | 280 |
| 2 | 200 | 290 |
| 3 | 200 | 280 |
| 4 | 190 | 230 |
| 5 | 200 | 270 |
| 6 | 210 | 300 |
| 7 | 180 | 300 |
| 8 | 190 | 270 |

| | | |
|---|---|---|
| 9 | 200 | 290 |
| 10 | 180 | 300 |
| 11 | 210 | 240 |
| 12 | 220 | 280 |
| 13 | 180 | 260 |
| 14 | 200 | 290 |
| 15 | 190 | 300 |
| 16 | 190 | 260 |
| 17 | 190 | 260 |
| 18 | 200 | 280 |
| 19 | 210 | 340 |
| 20 | 190 | 300 |
| 21 | 200 | 300 |
| 22<br>23 | 190<br>210 | 300<br>340 |
| 24 | 180 | 300 |
| 25 | 180 | 300 |

### 8.2.2. Propriedades mecânicas

#### 8.2.2.1. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas placebo.

| Rata | Carga máxima (N) | Deformação Máxima ($x10^{-3}$ m) | Rigidez ($x\ 10^{3}$ N/m) | Resiliência ($x10^{-3}$ J) | Tenacidade ($x10^{-3}$ J) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 107.917 | 0.622 | 142.9 | 3.8 | 33.0 |
| 2 | 92.502 | 0.453 | 206.1 | 17.9 | 21.0 |
| 3 | 129.173 | 0.579 | 335.5 | 10.2 | 46.4 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 107.947 | 0.491 | 274.4 | 11.0 | 30.8 |
| 5 | 104.938 | 0.495 | 304.6 | 12.2 | 31.9 |
| 6 | 98.098 | 0.786 | 115.6 | 4.2 | 42.5 |
| 7 | 86.475 | 0.635 | 146.5 | 8.05 | 30.9 |
| 8 | 91.140 | 0.610 | 171.4 | 6.6 | 32.7 |
| 9 | 79.870 | 0.710 | 151.2 | 15.2 | 37.3 |

**8.2.2.2. Valores das propriedades mecânicas dos fêmures das ratas do grupo de ratas tratadas.**

| Rata | Carga máxima (N) | Deformação Máxima ($x10^{-3}$ m) | Rigidez ($x\ 10^{3}$ N/m) | Resiliência ($x10^{-3}$ J) | Tenacidade ($x10^{-3}$ J) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 96.706 | 0.495 | 235.0 | 4.18 | 24.6 |
| 2 | 105.173 | 0.500 | 284.3 | 12.5 | 33.0 |
| 3 | 134.056 | 0.624 | 245.4 | 9.7 | 41.2 |
| 4 | 134.799 | 0.536 | 318.9 | 12.7 | 41.0 |
| 5 | 92.992 | 0.493 | 220.3 | 12.0 | 26.2 |
| 6 | 101.351 | 0.539 | 234.6 | 9.8 | 31.5 |
| 7 | 103.164 | 0.538 | 283.0 | 8.7 | 34.9 |
| 8 | 100.910 | 0.576 | 218.2 | 11.5 | 33.5 |
| 9 | 114.062 | 0.457 | 285.8 | 17.8 | 27.5 |
| 10 | 107.692 | 0.493 | 299.5 | 8.9 | 31.9 |
| 11 | 86.994 | 0.410 | 241.0 | 9.9 | 19.8 |
| 12 | 92.472 | 0.455 | 234.3 | 12.9 | 23.8 |

### 8.2.3. Quantidades de cálcio e fósforo

#### 8.2.3.1. Tabela da quantidade mineral óssea do grupo placebo.

| Cadinho | Cálcio (g/kg) | Fósforo (g/kg) |
|---|---|---|
| 1 | 414.15 | 142.44 |
| 2 | 241.73 | 108.36 |
| 3 | 255.36 | 159.06 |
| 4 | 272.64 | 136.84 |
| 5 | 500.56 | 178.28 |
| 6 | 450.00 | 163.41 |

#### 8.2.3.2. Tabela da quantidade mineral óssea do grupo tratado.

| Cadinho | Cálcio (g/kg) | Fósforo (g/kg) |
|---|---|---|
| 1 | 228.0 | 100.24 |
| 2 | 232.0 | 105.85 |
| 3 | 248.0 | 99.66 |
| 4 | 249.0 | 102.24 |
| 5 | 245.64 | 105.1 |
| 6 | 263.4 | 115.53 |
| 7 | 467.47 | 135.46 |
| 8 | 209.81 | 108.85 |
| 9 | 268.6 | 117.81 |
| 10 | 253.16 | 116.18 |
| 11 | 475.96 | 185.14 |
| 12 | 475.96 | 195.86 |
| 13 | 536.85 | 188.89 |
| 14 | 534.41 | 188.89 |

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; SATO, K.; MIYAKOSHI, N.; KUDO, T.; TAMURA, Y.; TSUCHIDA, T.; KASUKAWA, Y. (1999). Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. *Bone*, v. 24, n. 6, p. 591-596, jun.

ABRAMSON, A.S.; DELAGI, E.F. (1961). Influence of weight-bearing and muscle contraction on disuse osteoporosis. *Arch Phys Med Rehabil*, v. 42, p. 147-151. Apud SINAKI, M. (1995). Musculoskeletal Rehabilitation. In: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J.III. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis, and Management*. 2ª edição. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Cap. 20, p. 435-470.

AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH (1999). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral Metabolism*. 4.ed. Editora LWEW.

ARAI, T.; OHASHI, T.; DAITOH, Y.; INOUE, S. (1993). The effect of ultrasound stimulation on disuse osteoporosis. *Thirteenth Annual Meeting of Brags Dana Point*, CA.

ARDRAN, G.M. (1951). Bone destruction not demonstrable by radiography. *Br J Radiol*. v.24, p. 7-109. Apud IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

ARNOLD, J.S. et al. (1966). Skeletal changes in aging and disease. *Clin Orthop. Rel Res*, v. 49, p. 17-37.

ARNOLD, J. S. (1980). Trabecular pattern ans shapes in aging and osteoporosis. Metab Bone Dis Relat Res, v. 2S, p. 297-308 Apud ABE, T.; SATO, K.; MIYAKOSHI, N.; KUDO, T.; TAMURA, Y.; TSUCHIDA, T.; KASUKAWA, Y. (1999). Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. *Bone*, v. 24, n. 6, p. 591-596, jun.

BASSET, C.A.L. (1965). Biologic significance of piezoeletricit. *Calcif Tissue Res*, v. 1, p. 252-272. Apud DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

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

BIERING-S∅RENSEN, F.; BOHR, H,; SCHAADT, MD. (1988). Bone mineral content of the lumbar spine and lower extremities years after spinal cord lesion. *Paraplegia*, v. 26, p. 293-301.

BOGLIOLO, L. (1993). *Patologia.* 3ª ed. RJ, Editora Guanabara.

BOHR, H.; SCHAADT, O. (1985). Bone mineral content of the femoral neck and shaft: relation between cortical and trabecular bone. *Calcif Tissue Int*, v. 37, p. 340-344. Apud BONE DENSITY MEASUREMENT - A SYSTEMATIC REVIEW.(1997). *Journal of Internal Medicine*, v. 241(suplemento 739), p. 5-11.

BOLANDER, M.E. (1997). Personal communication. Apud KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg [AM], v. 79; p. 961-973.

BONE DENSITY MEASUREMENT - A SYSTEMATIC REVIEW (1997). *J. Intern Med*, v. 241 (suplemento 739), p 1-60.

BONNICK, S.L. (1994). *The osteoporosis handbook: Every woman's guidee to prevention and treatment.* Taylor Publishing Company.

BOYDE, A. Scanning electron microscope studies of bone. In: BOURNE, G.H. (1972). The biochemistry and physiology of bone: Structure. 2a edição. New York: Academic Press, v. 1, p. 259-310.

BURGER, E.H.; KLEIN-NULEND, J. (1998). Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone, v.* 22, n. 5, suplemento 1, p. 127S-130S.

BUSH, T. CRIQUI, M., COWAN, L. (1987). Cardiovascular disease mortality in women: results from the lipid research clinics follow-up study. *Coronary Heart*

*Disease in Women*. Eaker E, Packard, B, Wenger, N (eds). New York, Haymarket, Doyma, p. 106-111. Apud IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

CANOTILHO, M.M. (1996). *Osteoporose experimental em ratas. Efeitos da administração crônica de ácido acetilsalicílico*. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de São Carlos.

CANTARELLI, F.B. (1997). *Adaptação, reprodutibilidade e validação do "Osteoporosis Assessment Questionnaire" na avaliação da qualidade de vida de pacientes com fraturas por osteoporose*,. Dissertação (Mestrado em Reumatologia) - Escola Paulista de Medicina. São Paulo.

CHAKKALAKAL, D.A.; LIPPIELLO, L.; WILSON, R.F.; SHINDELL, R.; CONNOLLY, J.F. (1990). Mineral and matrix contributions to rigity in fracture healing. J Biomech, v. 23, n. 5, p. 425-434.

CHARMAN, R.A. (1990). Part 4: Strain Generated potencials in Bone na Conective Tissue. *Physiotherapy*, v. 76, n. 11, p. 682-689.

CHESNUT, C. H. III (1995). Drug therapy: calcitonin, biphosphates, and anabolic steroids. In: RIGGS, B.L; MELTON, L.J.III *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven. Cap. 18, p. 391-401.

CHRISCHILLES, E. A.; BULTER, C.D.; DAVIS, C.J.; WALLACE, R.B. (1991). A model of lifetime osteoporosis impact. *Arch. Intern. Med.*, v.151, p. 2026-2032. Apud DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

COLOMBO, S.J.M. (1992). *Efeitos da variação da intensidade acústica da consolidação ultra-sônica de fraturas experimentais*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, Campus de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CONSENSUS DEVELOPMENT CENTER (1991). Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, v. 90, p. 107-110. Apud IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. (1993). Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, *Am. J. Med.* Apud DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

COWIN, S.C. (1989).Cortical bone. In: Cowin Stephen C. Bone Mechanics. Florida. CRC Press, p. 98-142.

CUMMINGS, S.R.; RUBIN, S.M.; BLACK, D. (1990). The future of hip fractures in the United States. *Clin Orthop*., v. 252, p. 163-166. Apud WASNICH, R.D. (1999). Epidemiology of osteoporosis. In: AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral Metabolism*. 4.ed. Editora LWEW. Cap. 46, p. 257-259.

CURREY, J.D. (1979). Changes in the impact energy absorption of bone with age. *J biomech*, v. 12, p. 459-469. Apud JOHNSTON, C.C.; MELTON, L.J.III. (1995). Bone densitometry. In: RIGGS, B.L; MELTON, L.J. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. Cap.12, p. 275-297.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. (1993). Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy and estrogen substitution. *Calcif. Tissue Int*, v.52, p. 26-33.

DANOWSKI, J.S.; AZEVEDO, M.N.L. (1996). Osteoporose: conceito, classificação e clínica. *ARS CVRANDI Clínica médica*, v. 29, jun. Apud DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

DAWSON-HUGHES, B. (1999) Pharmacologic Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. In: An Official Publication of the American Society for Bone and Mineral Research. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Cap. 46, p.283-292.

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

DEMPSTER, D.W. (1995). Bone remodeling. In: RIGGS, B.L; MELTON, L.J. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. Cap.3, p. 67-91.

DEMPSTER, D.W.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; LINDSAY, R.; SHEN, V. (1995). Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone*, v. 16, n. 1, p. 157-161.

DEMULDER, A.; GUNS, M.; ISMAIL, A.; WILMET, E.; FONDU, P.; BERGMANN, P. (1998). Increased osteoclast-like cells formation in long-term bone marrow cultures from patients with a spinal cord injury. *Calcified Tissue International*, v, 63, p. 396-400.

DEPARTMENT OF PHYSICAL MEDICINE AND REHABILITATION (1997). Biomechanical properties of human tibias in long-term spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev*, v. 34, n. 3, p. 295-302, jul

DEVLIN, H.; FERGUSON, M.W.J.; CARTER D.H. (1990). Cancellous bone resorption in the proximal ilium of the ovariectomized rat. *Calcified Tissue International*, v. 46, p. 395-400.

DEVOGELAER, J.P.; DEUXCHAISNES, C.N. (1993). Osteoporosis. *Br. J. Rheumatol.*, 32 (suppl. 4): 48-55.

DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

DUARTE, L.R. (1983). The Stimulation of Bone Growth by Ultrasound. *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery*, v. 101, p. 153-159.

DUNCAN, R.L.; TURNER C.H. (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified Tissue International*, v. 57, n. 344-358.

DYSON, M.; BROOKES, M. (1983). Stimulation of Bone Repair by Ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*, Suplemento 2, p. 61-66.

EASTELL, R. (1999). Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. In: AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE

AND MINERAL RESEARCH. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4. ed. Editora LWEW. Cap. 47, p. 260-262.

FONTANA, A.; DELMAS, P.D. (1999). Bone and hormones, estrogen and antiestrogen: action on osteoporosis. *Presse Med*, v. 28, p. 555-558. Apud IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

FRANKEL, V.H. (1998). Results of prescription use of pulse ultrasound therapy in fracture management. Surgical Techonology International VII *(Orthopaedic Surgery):* 389-393.

FREEMAN, L.W. (1949). The metabolism of calcium in patients with spinal cords injuries. *Ann Surg*, v. 129, p. 177-184. Apud SINAKI, M.(1995). Musculoskeletal Rehabilitation. In: RIGGS, B. L; MELTON, L.J.III *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. New York, Lippincott-Raven. Cap.20, p. 435-473.

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

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

FYHRIE, D. P.; KIMURA, J. H. (1999). Cancellous bone biomechanics. *Journal of Biomechanics*, v. 32, p. 1139-1148.

GARLAND, D.E.; STEWART, C.A; ADKINS, R.H.; HU, S.S.; ROSEN, C.; LIOTTA, F.J.; WEINSTEIN, D.A. (1992). Osteoporosis after spinal cord injury. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 10, p. 371-378.

GOLD, D.T.; DREZNER, M.K. (1995). Quality of life. In: RIGGS, B.L.; , L.J.III. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. Philadelphia, Lippincott- Raven. Cap. 21, p. 475-486.

GOLDBERG, B.B. (1997). Personal communication. Apud KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg [AM], v. 79; p. 961-973.

GROSSI, R.; CAMPELLO, E.C.; OLIVEIRA, N.A.L.; GROSSI, C.V. (1996). Fraturas osteoporóticas: Clínica e tratamento ortopédico. *ARS CVRANDI Clínica Médica***,** vol. 29, junho.

GUYTON, A.C. (1988). *Tratado de Fisiologia Médica***.** 6 ed. RJ, Guanabara.

HADJIARGYROU, M.; MCLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. (1998). Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clinical Orthopaedics And Related Research, n. 355S, p. S216-S229.

HADJIDAKIS, D.; LEMPERT, U.G.; MINNE, H.W. (1993). Bone loss in experimental diabetes. *Hormon Metab Research*, v. 25, p. 77-81.

HECKMAN, J.D.; RYABY, J.P.; McCABE, J, et al. (1994). Acceleration of tibial fracture-healing, by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg [AM]*, v. 76; p. 26. Apud HADJIARGYROU, M.; MCLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. (1998). Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clinical Orthopaedics And Related Rese*arch, n. 355S, p. S216-S229.

HIRSCH, C.; BRODETTI, A. (1956). The weight-bearing capacity of structural elements in femoral necks. *Acta Orthop Scand*, v. 26, p. 15-24. Apud JOHNSTON, C.C.; MELTON, L.J.III. (1995). Bone densitometry. In: RIGGS, B.L; MELTON, L.J. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. Cap.12, p. 275-297.

IBGE: http://www.ibge.gov.br (25-02-2000).

IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

ITO, M.; AZUMA, Y.; HARADA, Y. et al. (1998). Low intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing in a rat femoral fracture model. *Trans Orthop Res Soc*, v. 23, p. 732. Apud HADJIARGYROU, M.; MCLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. (1998). Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clinical Orthopaedics And Related Research*, n. 355S, p. S216-S229.

JACOBSEN, S.J.; COOPER, C.; GOTTLIEB, M.S.; GOLDBERG, J.; YAHNKE, D.P.; MELTON, L.J. (1992). Hospitalization with vertebral fracture among the aged: a national population- based study, 1986-1989. *Epidemiology*, v. 3, p. 515-8. Apud ULLOM, M.P. (1999). Prevention of osteoporosis and fractures. *Am. Fam. Physician*. v. 60, n. 1, p. 194-202.

JINGUISH, S.; AZUMA, Y.; ITO, M. et al. (1998). Effects of non-invasive pulsed low-intensity ultrasound on rat femoral fracture. Third World Congress of Biomechanics, Supporo, Japan, 1756. Apud HADJIARGYROU, M.; McLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. (1998). Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 355S, p. S216-S229.

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

JONES. L.M.; GOULDIND, A.; GERRARD, D.F. (1998). DEXA: a practical and accurate tool to demonstrate total and regional bone loss, lean tissue loss and fat mass gain in paraplegia. *Spinal Cord*, v. 36, p. 637-640.

KALU, D et al (1989). The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. Endocrinology, v. 124, n. 1, p. 7-16.

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

KANIS, J.A (1993). The incidence of hip fractures in Europe. *Osteoporosis Int*, v. 3 (suppl 1): p. S10-S15. Apud DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

KANNUS, P.; NIEMI, S.; PARKKARI, J.; PALVANEN, M.; VUORI, I.; JŸARVINEN, M. (1999). Hip fracture in Finlandia between 1970 and 1997 preditions for the future. *Lancet.* v. 6, p. 353.

KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg [AM], v. 79; p. 961-973.

LEDERMAN, R.; CARNEIRO, R.A. (1996). Osteoporose: saúde pública no Brasil. *ARS CVRANDI Clínica Médica,* v. 29, p.17-24, junho.

LINDSAY, R.; HART, D.M.; BAIRD, C. et al. (1980). Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomised women. *Lancet*, v. 2, p. 1151-1157.

LINDSAY, R. (1995). Estrogen Deficiency. In: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. 2.ed. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. Cap.6, p. 133-160.

LINDSAY, R. (1999). Prevention of osteoporosis. In: A OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4. ed. Editora LWEW. Cap. 49, p. 264- 270.

LUKERT, B.P. (1999). Glucocorticoid-induced osteoporosis. In: AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4. ed. Editora LWEW. Cap.55, p. 292-295.

LU, P.W.; BRIODY, J.N.; OGLE, G.D.; MORLEY, K.; HUMPHRIES, I.R.J.; ALLEN, J; HOWMAN-GILES, R.; SILLENCE, D.; COWELL, C.T. ( 1994). Bone mineral density of total body, spine, and femoral neck in children and young adults: a cross-sectional and longitudinal study. *J Bone Miner Res*, v. 9, p. 1451-1458. Apud HEANEY, R.P.; MATKOVIC, V. (1995). Inadequate peak bone mass. In: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J.III. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. New York, Lippincott-Raven. Cap. 5, p. 115-129.

LYNN, S.G.; SINAKI, M.; WESTERLIND, C. (1997). Balance characteristics of persons with osteoporosis. *Arch Phys Med Rehabil*, v. 78, p. 273-277.

MAROTTOLI, R.A.; BERKMAN, L.F.; COOPEY, L.M.Jr. (1992). Decline in physical function following hip fracture. *J. Am geriatr Sac*, v. 40, p. 861-6.

MARTENS, M.; VAN AUDEKERCKE, R.; DELPORT, P.; DE MEESTER, P.; MULIER, J.C. (1983). The mechanical characteristics of cancellous bone at the upper femoral region. *J. Biomech*, v. 16, p. 971-983.

MAYR, E.; FRANKEL, V.; RÜTER, A. (2000). Ultrasound - an alternative healing method nonunions? *Arch Orthop Trauma Surg*, v. 120, p. 1-8.

MELTON, L.J.III; RIGGS, B.L. (1985). Risk factors for injury after a fall. *Clin Geriatr Med*, v. 1, p. 525-39.

MOHR, T; PØDENPHANT, J.;BIERING-SØRENSEN, F.; GALBO, H.; THAMSBORG, G.; KJAER, M. (1997). Increased bone mineral density after prolonged electrically induced cycle training of paralyzed limbs in spinal cord injured man. *Calcif Tissue Int*, v. 61, p. 22-25.

MORTIMER, A.J.; DYSON, M. (1988). The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v. 14, p. 499-506. Apud MAXWELL, L. (1992). Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular e molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy*, v. 78, n. 6, p. 421-425.

MOSEKILDE, L.; SOGAARD, C.H.; McOSKER, J.E.; WRONSKI, T.J. (1994). PTH has a more pronounced effect on vertebral bone mass and biomechanical competence than antiresorptive agents (estrogen and biphosphonate) - assessed in sexually mature, ovariectomized rats. Bone, v. 15, p. 401-408.

MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J.S.; ORHII, P.B.; KALU, D.N. (1998). Growth hormone increases vertebral and femoral bone strenght in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. Bone, v.23, n. 4, p. 343-352.

MOYLE, D.D.; WALKER, M. W. J. (1986). The effects of a calcium deficient diet on the mechanical properties and morphology of goose bone. *J. Biomech*, v.10, n.8, p. 613-625.

MUNDY, G. R. (1999). *Bone Remodeling and Its Disorders*. 2. ed. London, Martin Dunitz.

NARUSE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; AZUMA, Y.; ITO, M.; OOTA, T.; KAMEYAMA, K-z.; ITOMAN, M. (2000). Anabolic response of mouse-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 268, p. 216-220.

PARFITT, AM. (1984). Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int*, v. 36, p. S123-S128.

PARFITT, A. M.; MATHEWS, C. H. E.; VILLANUEVA, A. R.; KLEEREKOPER, M.; FRAME, B.; RAO, D. S. (1983). Relationship between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. J. Clin Invest, v.

72, p. 1396-1409 Apud ABE, T.; SATO, K.; MIYAKOSHI, N.; KUDO, T.; TAMURA, Y.; TSUCHIDA, T.; KASUKAWA, Y. (1999). Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. *Bone*, v. 24, n. 6, p. 591-596, jun.

PASTORE, K. (1997). Perigo Invisível. Veja, ed. n.1502, p. 62-64.

PEAD, M.J.; LANYON, L.E. (1989). Indomethacin modula tion of load-related stimulation of new bone formation in vivo. *Calcified Tissue International*, v. 45, p. 34-40. Apud RODAN, G.A.; RODAN, S.B. (1995). The cells of bone. In RIGGS, B.L.; MELTON, L.J.III. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. New York, Lippincott-Raven. Cap. 1, p. 1-39.

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

PILLA, A. A.; MONT, M.A.; NASSER, P.R.; KLAN, S.A.; FIGUEIREDO, M.; KAUFMAN, J.J.; SIFFERT, R.S. (1990). Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma*, v. 4, n. 3, p. 246-253.

PLAPLER, P.G. (1997). Osteoporose e Exercícios**.** *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med,* SP, v. 52, n. 3, p. 163-170. Apud DRIUSSO, P. (2000). *Efeitos de um programa de atividade física na qualidade de vida em mulheres com osteoporose*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

POHLMAN, R.L.; DARBY, L.A.; LECHNER, A.J. (1985). Morphometry and calcium contents in appendicular and axial bones of exercised ovariectomized rats. *Am J Physiol*, 248: R12-R17.

RAWOOL, D. GOLDBERG, B.; FORSBERG et al. (1997). Power doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low intensity ultrasound. Trans 83rd Radiol Soc North Am, v. 83, p. 421.

RECKER, R.R. (1993). Current therapy for osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, v. 76, n. 1, p. 14-16.

RIGGS, B.L.; WAHNER, H.W.; DUNN, W.L.; MAZESS, R.B.; OFFORD, K.P.; MELTON, L.J.III (1981). Differential changes in bone mineral density of the

appendicular and axial skeleton with aging: relantionship to spinal osteoporosis. *J. Clin Invest*, v. 67, p. 328-335 Apud LINDSAY, R. (1995). Estrogen Deficiency. In: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. 2.ed *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. Cap.6, p. 133-160.

RINGE, J. D.; DORST, A.J. (1998). Osteoporosis in the men: diagnosis and therapy. *Ther Umsch*, v. 55, p. 717-723. Apud IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

ROBBINS, S. (1994). Patologia Estrutural e Funcional. 5ª ed. RJ, Editora Guanabara.

ROSS, M.H.; ROWRELLE, L.J.; KAYE, G.I. (1995). Histology - A text and atlas. 3ª ed., Baltimore, Williams & Wilkins.

ROUDEBUSH, R.E. (1993). Effects of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat. *Calcif Tissue Int*., v.53, p. 61-64.

RYABY, J.T; MATTHEW, J.; PILLA, A.A.; DUARTE-ALVES, P. (1991). Low intensity pulsed ultrasound modulates adenylate cyclase activity and transforming growth factor beta synthesis. In: BRIGHTON, C.T.; POLLACK, S.R. (eds). Eletromagnetics in biology and medicine. San Francisco, San Francisco Press, p. 95-100.

RYABY, J.T.; MATHEW, J.; DUARTE-ALVES, P. (1992). Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase and TGF-β synthesis in osteoblastic cells. Trans Orthop Res Soc, v. 17, p. 590. Apud KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg [AM], v. 79; p. 961-973.

SILVA, O.L. (1987). Estudo do mecanismo de ação do ultra-som na estimulação de crescimento ósseo. 215p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos- Universidade de São Paulo.

SIMS, N.A.; MORRIS, H.A.; MOORE, R.J.; DURBRIDGE, T.C. (1996). Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovarectomized rat. *Calcified Tissue International*, v. 59, p. 121-127.

SINAKI, M.(1995). Musculoskeletal Rehabilitation. In: RIGGS, B. L; MELTON, L.J.III *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. New York, Lippincott-Raven. Cap.20, p. 435-473.

Sites of osteoporotic fractures: http://www.merck.com/pro/osteoporosis/inde51.htm (25-11-2000).

SOGAARD, C.H.; DANIELSEN, C.C.; THORLING, E.B.; MOSEKILDE, L. (1994). Long-term exercise of young and adult female rats: Effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. J. Bone Miner Res, v.9, p. 409-416.

SPADARO, J.A.; ALBANESE, S.A. (1998). Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 24, n. 4, p. 567-573.

STAMPFER, M.; COLDITZ, G. (1991). Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiological evidence. *Prev Med*, v. 20, p. 47-63. Apud IQBAL, M. M. (2000). Osteoporosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Southern Medical Journal*. v. 93, n. 1, p. 2-17.

SZEJNFELD, V.L. (1997). Osteoporose. In: GRUPO DE COLABORADORES ESPECIALIZADOS. *Atualização Terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento*. 18. ed. São Paulo, Artes Médicas, p. 601-604.

TANIZAWA, T.; YAMAGUCHI, A.; UCHIYAMA, Y.; MIYAURA, C.; IKEDA, T.; EJIRI, S.; NAGAI, Y.; YAMATO, H.; MURAYAMA, H.; SATO, M.; NAKAMURA, T. (2000). Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. *Bone*, v. 26, n. 1, p. 43-53.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C. M.; KE, H.Z. (1995). FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, v. 17, n. 4 (suppl), p. S125-S133.

TUREK, S.L. (1991). *Ortopedia*: princípios e sua aplicação. 4ª ed. SP, Editora Manole, vol 1.

TURNER, C. H. (1998). Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone*, v. 23, n. 5, p. 399-407.

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

ULLOM, M.P. (1999). Prevention of osteoporosis and fractures. *Am. Fam. Physician*, v. 60, n. 1, p. 194-202.

VERSLUYSEN S.J. et al (1986). How elderly patients with femoral fracture develop pressure scores in hospital. *Br Med J*, v. 292, p. 1311-1313. Apud http://uddo.com/osteoporose (19-03-2001).

XAVIER, C.A.M. e DUARTE, L.R. (1983). Estimulação ultra sônica do calo ósseo. Aplicação clínica. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 18, n. 3, p. 73-80.

WANG, S-L-; LEWALLEN, D.G.; BOLANDER, M.E.; et al. (1994). Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res*, v. 12, p. 40-47.

WASNICH, R.D. (1999). Epidemiology of Osteoporosis. In: AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 4. ed. Editora LWEW. Cap.46, p. 257-259.

WILKIN, T.J. (1999). Changing perceptions in osteoporosis. *BMJ*, v. 318, n. 7187, p. 862-4.

WRONSKI, T.J. et al (1987). Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, v. 40, p. 155-159.

WRONSKI, T.J.; YEN, C-F. (1991). The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells Mater*, Suplemento 1, p. 69-74 Apud FROST, H.M.; JEE, W.S.S. (1992). On the rat model of human osteopenias and osteoporoses**.** *Bone and Mineral*, v. 18, p. 227-236.

WYSE, D.M.; PATTEE, C.J. (1954). Effect of the oscillating bed and tilt table on calcium, phosphorus and nitrogen metabolism in paraplegia. *Am J Med*, v. 17, p. 645-661. Apud SINAKI, M.(1995). Musculoskeletal Rehabilitation. In: RIGGS, B. L; MELTON, L.J.III *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 2. ed. New York, Lippincott-Raven. Cap.20, p. 435-473.

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