

**CAROLINA RUBIO VICENTINI**

**ANÁLISE DENSITOMÉTRICA,  
HISTOMORFOMÉTRICA  
E BIOMECÂNICA EM FÊMURES DE RATOS  
SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE CARGA E ATIVIDADE  
FÍSICA EM ESTEIRA**

Araçatuba-SP  
2006

**CAROLINA RUBIO VICENTINI**

**ANÁLISE DENSITOMÉTRICA,  
HISTOMORFOMÉTRICA E BIOMECÂNICA EM  
FÊMURES DE RATOS SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE  
CARGA E ATIVIDADE FÍSICA EM ESTEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de mestre na área Fisiopatologia Médica e Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada  
Co-orientadora: Profa. Dr. Luciana Del Rio Pinoti Ciarline

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V633a      Vicentini, Carolina Rubio  
            Análise densitométrica, histomorfométrica e biomecânica em  
            fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade  
            física em esteira / Carolina Rubio Vicentini. - Araçatuba : [s.n.],  
            2006  
            65 f.

            Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
            Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2006  
            Orientador: Prof. Dr. Mário Jeffeson Quirino Louzada  
            Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarline

            1. Ausência de carga 2. Densidade óssea 3. Histomorfometria  
            4. Ensaio mecânico

CDD 636.089

*Dedico este trabalho a Deus,  
aos **meus pais** e ao meu  
orientador e incentivador  
Prof. Mário Jefferson  
Quirino Louzada.  
OBRIGADA POR TUDO!*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por me guiar e iluminar diante da vida.*

*Tudo só foi possível porque “Ele” esteve presente a todo momento.*

*Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada, pelos ensinamentos científicos, filosóficos e lições de vida. Toda minha admiração pela dedicação dispensada a esta pesquisa e pelo ser humano incomparável que é.*

*A minha co-orientadora Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinotti Ciarline pela oportunidade em aceitar-me mesmo sem me conhecer, e por estar sempre disposta a ajudar e contribuir em meu aperfeiçoamento diante a pesquisa.*

*Aos meus pais, que são luz na minha vida, e sonharam com esse momento tanto quanto eu, acompanharam-me todos os instantes, proporcionando-me condições necessárias para o meu crescimento intelectual. O amor de vocês continua sendo meu maior guia. Meu amor por você, PAI, e por você, MÃE, é inesgotável.*

*Ao meu irmão – amigo, pelo auxílio na fase experimental e pela alegria que sua presença proporciona na nossa família.*

*A todos os meus familiares que participaram das minhas angústias e anseios e compreenderam a minha ausência quando o dever à pesquisa foi primordial.*

*Aos Professores da Pós-Graduação em Ciência Animal -Unesp – Araçatuba pelos valiosos conhecimentos transmitidos.*

*Aos Professores Dr. Paulo Ciarline e a Dra. Silvia Helena Venturoli Perri, pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.*

*Aos Professores que permitiram a realização desta pesquisa em seus Laboratórios. Em especial a Profa. Leda Salzedas e ao Prof Paulo Henrique Santos.*

*Aos Técnicos e funcionários da UNESP – Araçatuba que transmitiram com muita experiência os ensinamentos práticos.*

*Aos meus amigos e companheiros desta jornada pela amizade,*

*Às Bibliotecárias da UNESP-Araçatuba pelo auxílio e atenção,*

*As secretárias Valéria e Marina pela atenção e paciência,*

*Aos alunos e professores do Curso de Engenharia Mecatrônica do  
Centro Universitário Católico Auxilium pela confecção da esteira*

*Aos Alunos do Centro Universitário Católico Auxilium por colaborarem  
na fase experimental, Obrigada!*

*E tudo ficou melhor desde o momento em que “você” chegou a minha  
vida.*

*Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.*

**VICENTINI, C. R. Análise Densitométrica, Histomorfométrica e Biomecânica em Fêmures de Ratos Submetidos à Ausência de Carga e Atividade Física em Esteira. Araçatuba, 2006. 67f. Mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2006.**

## **RESUMO**

Diversas situações provocam alterações significativas na estrutura óssea, tais como a permanência de astronautas no espaço, imobilizações ortopédicas e permanência prolongada de pacientes em leito. A atividade física é contra medida para a recuperação dessas alterações causadas no sistema ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suspensão, do treinamento físico e da movimentação livre, através de análises biomecânicas, densitométricas e histomorfométricas em terço médio de fêmures de ratos. Foram utilizados setenta e cinco ratos machos, distribuídos em cinco grupos experimentais. Destes, dois utilizados como controle CI (21 dias) e CII (42 dias) e três suspensos por 21 dias. Dos suspensos um foi sacrificado logo após a suspensão, S, outro foi submetido a período de atividade física em esteira por 21 dias, SE, e o terceiro à movimentação livre por 21 dias, SL. A análise biomecânica não expressou diferenças significativas nos grupos SE e SL em nenhum dos parâmetros analisados (Força Máxima, Rigidez e Resiliência), já o grupo S apresentou redução significativas em todas as propriedades mecânicas estudadas. Na análise de densidade óssea, pelo Princípio de Arquimedes, encontrou-se diferença significativa entre o grupo S e CI e em relação aos grupos SE e SL.



Ocorreu diferença entre o grupo SE e SL. Na densidade óssea, pela Densitometria Radiográfica, o grupo S diferiu do CI, SE e SL e não ocorreu diferença entre os grupos SE e SL. A espessura óssea compacta pela análise histomorfométrica não sugeriu diferença significativa entre os grupos analisados. A suspensão de ratos pela cauda provocou reduções importantes nos valores de propriedades mecânicas e densitométricas do osso, o treinamento físico em esteira foi mais eficiente que a movimentação livre apenas na variável de densidade óssea pelo Princípio de Arquimedes.

**Palavra-chave:** ausência de carga; densidade óssea; histomorfometria; ensaio mecânico

**VICENTINI, C. R. Densitometry Analysis, Histomorfometry and Biomechanical in Femurs of Rats Submitted to the weightlessness and Treadmill Physical Activity. Araçatuba, 2006. 67f. Mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2006.**

## **SUMMARY**

Different situations provoke significant alterations in bone structure. The permanence of astronauts in the space, orthopedics immobilizations and drawn out permanence of patients in stream bed. The physical activity is against measure for the recovery of these alterations caused in the bone system. The objective of this study was to evaluate the influence of the suspension, the physical training and the released movement, through biomechanical, densitometry and histomorphometry analyses in mid third of femurs of rats. Seventy-five male rats were used, distributed in five experimental groups. Of these, two were used as control CI (21 days) and CII (42 days) three were suspended by 21 days. One of the suspended groups, S, was sacrificed soon after suspension, other one was submitted to 21 days treadmill physical exercise, SE, and the third group was submitted to 21 days released walking, SL. The biomechanical analysis did not express significant differences in SE and SL groups in none of the analyzed parameters (Maximum Force, Rigidity and Resilience), the S group presented significant reduction in all the mechanical properties analyzed. In the bone density analysis by Archimedes method, significant difference between group S and CI and in relation to groups SE and SL were found. Differences between group SE and SL occurred. In bone density, by Radiographic

Densitometry, group S differed from the CI, SE and SL and did not occur difference between SE and SL groups. The histomorphometry analyses had not suggested significant differences between the analyzed groups. The suspension of rats by the tail provoked important reductions in the values of mechanical properties and densitometry of the bone tissue, the treadmill physical training was more efficient than the released walking only in the variable of bone density by Archimedes Method.

**Keywords:** weightlessness; bone density; histomorphometry; mechanical trial.

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO-----	13
OBJETIVOS-----	23
GERAL-----	24
ESPECÍFICO-----	24
RESULTADOS-----	25
ARTIGOS-----	26
REFERÊNCIAS-----	61

## INTRODUÇÃO

### *Tecido ósseo*

O sistema ósseo é uma estrutura capaz de crescer, se adaptar e se reparar. Desempenha várias e importantes funções: suporte, movimento, proteção, estoque de minerais e formação de células sanguíneas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Funcionalmente pode ser dividido em axial e apendicular. Por esqueleto axial entende-se o conjunto de ossos do crânio, coluna vertebral e quadril e esqueleto apendicular fazem parte os ossos dos membros. Esta divisão apresenta aspectos práticos importantes, uma vez que estes dois setores podem responder de maneiras diferentes a uma série de estímulos (COWIN, 1988).

O tecido ósseo pode ainda ser dividido, sob o aspecto morfológico, em cortical e trabecular. Essa caracterização é feita já a nível macroscópico, sendo o cortical um osso compacto, enquanto o trabecular, como o próprio nome diz, é formado por inúmeras traves ósseas, tendo um osso esponjoso. O osso cortical é encontrado, predominantemente, nas diáfises dos ossos longos, e recobrimdo, com uma fina camada, a superfície do esqueleto axial, como as vértebras e as pelves. O osso trabecular pode ser encontrado nas epífises dos ossos longos, mas predominam entre as camadas corticais dos ossos chatos, como vértebras e escápula (MARTIN, 1993).

O tecido esquelético é constituído de uma matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). As células ósseas são compostas de osteoblastos células formadoras de osso. Os osteoblastos se desenvolvem de células indiferenciadas chamadas de pré-osteoblasto (células osteoprogenitoras), que

se desenvolvem de células mesenquimais embrionárias. Durante o processo de formação óssea, ocorre à deposição de cristais de hidroxiapatita. Este processo retém os osteoblastos em lacunas. Após os osteoblastos serem aprisionados nas lacunas, sua atividade se reduz, e eles tornam-se células ósseas maduras chamadas de osteócitos (SPENCE,1991).

Mesmo após se tornarem calcificados, estes ossos precisam necessariamente passar por extensas remodelações, para atender as mudanças de dimensões do corpo em crescimento. Esta remodelação é efetiva através da reabsorção de osso já previamente depositado por células grandes chamadas osteoclastos e pela deposição de novo osso em padrões que se acham de acordo com os requeridos pelo crescimento. Os osteoclastos, como os osteoblastos, também se originam de células osteoprogenitoras (AIRES,1999).

A matriz extracelular é composta quase exclusivamente de proteínas (90%), o colágeno, que participa de forma importante no processo de mineralização óssea. Os outros 10% correspondem a glicoproteínas, mucopolissacarídeos ácidos e lipídios. Os componentes inorgânicos da matriz óssea são compostos fundamentalmente de cálcio e fosfato.

O tecido ósseo é um tecido dinâmico, que está em constante modificação devido ao crescimento, a modelação e a remodelação óssea.

A remodelação óssea é um processo contínuo, caracterizado pela seqüência de ativação, reabsorção e formação, cujo ciclo demora cerca de 3 a 5 meses para se completar. Possui como função a renovação do tecido ósseo sem necessariamente alterar sua arquitetura, além de participar da homeostase do cálcio e de outros íons presentes no esqueleto.

### ***Efeitos da “ausência de carga” sobre a estrutura óssea***

Já é sabido que situações como imobilizações, vôos espaciais e pacientes acamados por longos períodos trazem alterações ao sistema ósseo.

Durante períodos de hipocinesia os padrões de movimento e força muscular são alterados e isto gera baixa tensão sobre ossos e músculos, e por conseqüência, menor massa será necessária para manter a integridade estrutural do sistema músculo-esqueleto (JONHSON, 1998; MOREY-HOTTON e GLOBUS, 1998). De acordo com Holick, 1998, essas alterações poderão resultar em fraturas quando do retorno ao ambiente normal.

Segundo Schaffer 2006, durante missões espaciais, a perda da densidade mineral óssea no terço proximal do fêmur e nas vértebras lombares a perda é de 1% a 2% ao mês, aproximadamente. Ou seja, uma perda de 20% ao ano, dez vezes mais do que ocorre com a perda no envelhecimento normal.

Em pessoas que permaneceram em repouso prolongado no leito a estrutura óssea reproduz efeitos semelhantes aos observados em vôos espaciais (LEBLANC et al., 1990).

### ***Simulação em animais***

O uso de ratos como modelo experimental no estudo de doenças e alterações nas funções do sistema esquelético é comum. Norman et al. 2000 relatam que este modelo impõe certas limitações na extrapolação dos resultados para humanos, mas as vantagens ainda são superiores às desvantagens.

O modelo de rato suspenso vem sendo usado desde as décadas de 60 para simular ambientes pobres de estímulos mecânicos.

Morey, em 1979, elaborou um modelo de suspensão onde o animal é fixado a uma malha ortopédica de maneira que os membros pélvicos permaneceram livres para movimentação, porém sem contato com o solo. O autor atingiu seu objetivo, induzir osteopenia, mas encontrou dificuldades na execução do modelo de suspensão, como alterações na circulação venosa e ulcerações provocadas pelo sistema de suspensão.

Musacchia et al. (1980), a partir do modelo criado por Morey 1979, descrevem modelo onde o rato foi suspenso pelo corpo, através de um pedaço de pano de brim. Neste modelo os animais permaneceram com apoio nos membros torácicos, e os membros pélvicos ficaram livres. Este modelo foi eficiente e os animais não apresentaram lesões durante o período em que permaneceram em suspensão (Figura 1).

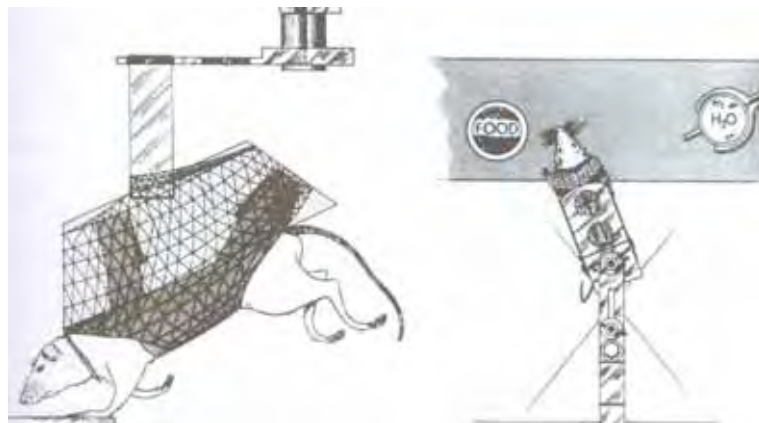


Figura 1. Modelo de suspensão pelo corpo. Fonte: MUSACHIA, et al.,1980

Em 1990, Kasper et al., elaboraram o modelo de rato suspenso pela cauda, fixado ao eixo de suspensão através de um sistema de roldanas. Os autores relataram que o sistema criado foi eficaz, pois promoveu limitação dos movimentos sem prejudicar a saúde geral do animal (Figura 2).



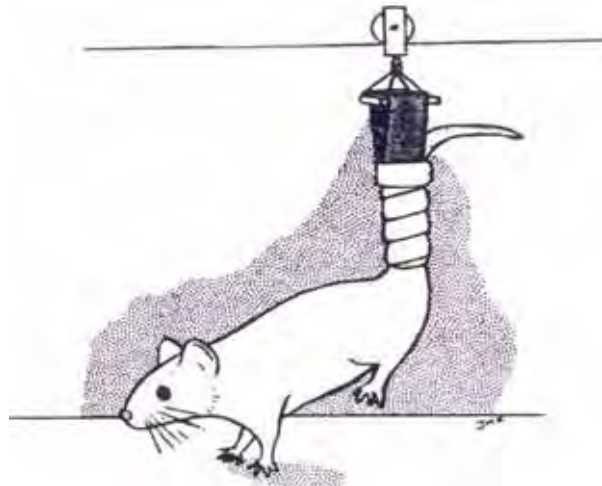


Figura 2. Modelo de suspensão pela cauda. Fonte KASPER, et al., 1993.

Em agosto de 2001, o procedimento de operação padrão para os efeitos proporcionados pela ausência de carga, com aplicação em ratos jovens e adultos foi atualizado e aprovado pela National Aeronautics and Space Administration (NASA), Ames Research Center (ARC), Institutional Animal Care and Use Committee.

Silva e Volpon (2004) e Shimano (2006) suspenderam ratos pela cauda, e para isso usaram enfaixamentos de espuma adesiva e tira elástica até terço médio desta cauda. O restante da cauda foi amputada, afim de evitar necrose e ulcerações. Este modelo permitiu livre movimentação aos animais, porém sem o apoio dos membros pélvicos. Os membros torácicos permaneceram em contato com o piso da gaiola. O sistema de fixação dos animais também foi adaptado a uma caixa de acrílico como mostra a Figura 3. Os animais permaneceram neste sistema durante 7, 14 e 21.

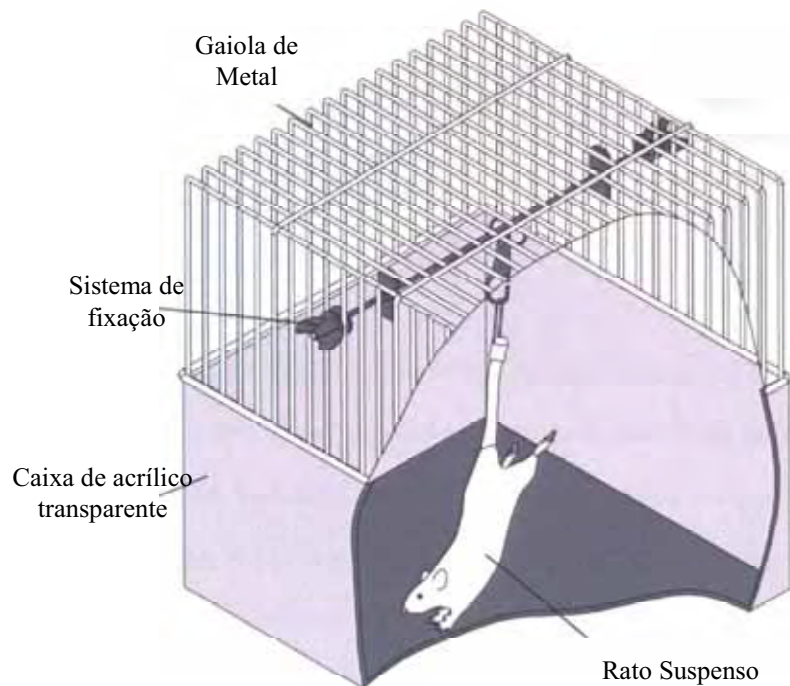


Figura 3. Desenho Esquemático do rato suspenso pela cauda. Fonte SHIMANO, 2006.

## ***Treinamento***

O exercício físico é indicado com o intuito de amenizar ou prevenir a atrofia muscular e a perda de massa óssea (NORMAM et al., 2000; YEH et al., 1992; TUUKKANEN e VÄÄNÄNEN, 1994; SHIMANO, 2006).

Os efeitos dos exercícios sobre o sistema esquelético dependem de fatores como o tipo, a intensidade, a duração do exercício e ainda o tipo do osso (cortical ou esponjoso). Tanto o osso cortical quanto o esponjoso sofrem influência do exercício físico.

Väänänehk (1993) relata que a influência da atividade física no tecido esponjoso é mais intensa do que no tecido cortical, devido a enorme quantidade de trabéculas ósseas.

Exercícios aeróbicos têm sido a contramedida para atenuar a perda óssea e muscular. (NORMAN et al., 2000). Em estudos com animais submetidos ao

treinamento físico em esteira, após período de hipocinesia, tem-se observado de massa óssea e atenuação da perda de massa óssea (FLUCKEY et al., 2002).

A atividade física, no espaço, ainda não é suficiente para controlar as perdas de massa óssea e de densidade óssea, um dos motivos pode ser devido à falta de metodologias de treinamento (CAVANAGH et al., 2005).

Fluckey, em 2002, submeteu ratos a exercícios em esteira concomitantemente ao período de suspensão por 4 semanas. Os exercícios possuíam resistência, e apresentaram-se eficientes na recuperação dos valores de densidade mineral óssea.

O exercício físico prolongado e contínuo provocou aumento nos valores de densidade mineral óssea no complexo tíbia/fíbula de ratos submetidos à corrida em esteira por 1 hora, 5 vezes por semana, durante 60 dias (YEH et al., 1992). Estes autores comentaram que muitas vezes o efeito benéfico do exercício requer um tempo relativamente longo. De acordo com Shimano (2006), isto é particularmente verdade quando se trabalha com ratos mais velhos, em que a heterogeneidade da amostra aumenta.

### ***Ensaio mecânico***

O comportamento de um material quando sujeito aos esforços de natureza mecânica, são definidas por suas propriedades mecânicas, estas, determinam sua capacidade em transmitir e resistir esforços aplicados (CHIAVERINI,1979)

De acordo com Souza (1974), as propriedades mecânicas de um material podem ser determinadas por ensaios mecânicos tais como: tração, compressão, flexão, cisalhamento e a combinação destes.

Vários fatores influenciam os resultados das propriedades mecânicas no ossos.

Sedlin (1965) cita que estes resultados sofrem dependência direta do tipo do osso (trabecular e cortical), da reparação óssea, condições de armazenamento da amostra, tratamento aos quais os animais passaram, entre outras.

Dentre os ensaios utilizados, o de flexão em três pontos é simples, dispensa acessórios especiais, e fornecem parâmetros fundamentais das propriedades mecânicas dos ossos. O ensaio consiste em colocar o osso sob dois apoios, com vão entre eles e aplicar uma força no osso no ponto médio deste vão (figura 4), obtendo assim uma curva força *versus* deslocamento, de onde se avaliará a força máxima admitida, a rigidez e a resiliência. No osso no ponto médio deste vão

### ***Força Máxima***

$F_{m\acute{a}x}$  é o maior valor de força observada no ensaio mecânico.

### ***Rigidez***

É definida pela deformação observada no corpo, em resposta à força aplicada. Quanto maior a rigidez, menor a deformação resultante da aplicação de uma tensão. É obtida através da inclinação da curva força *versus* deformação na fase elástica da curva.

### ***Resiliência***

A resiliência é a energia absorvida pelo corpo na fase elástica e é obtida calculando-se a área sob a curva força x deformação.

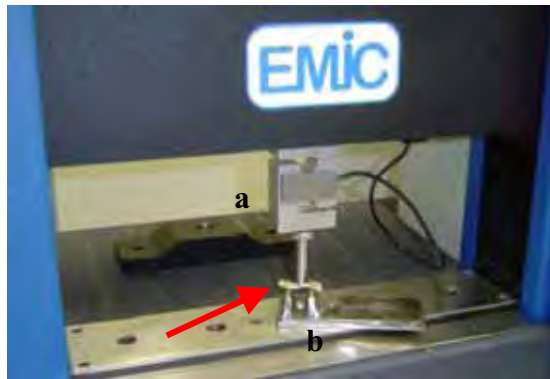


Figura 4. Máquina Universal de Ensaios Emic utilizada em ensaios mecânicos, onde (a) é célula de carga e (b) o vão de apoio. A seta indica o osso fêmur no vão de apoio pronto para o início do ensaio biomecânico.

## *Densidade Óssea*

### *Densitometria Radiográfica*

A densitometria radiográfica (DR) fornece meio para mensurar e determinar a relação existente entre a quantidade de luz recebida por uma película sensível e seu correspondente enegrecimento, direto ou por um revelador.

A densitometria radiográfica vem sendo utilizada para avaliar a densidade óssea e é referida como recurso útil no diagnóstico e orientação terapêutica com vistas ao tratamento de doenças osteometabólicas, estudo de reparações ósseas de fraturas e procedimentos cirúrgicos (LOUZADA et al., 2001).

### *Princípio de Arquimedes - Empuxo*

O princípio de Arquimedes pode ser utilizado para avaliar a densidade óssea -  $d_o$ , usando balança adequada onde se obterá além da massa óssea -  $m$ , sua massa aparente -  $m_{ap}$  e calculada através da expressão:

$$d_o = dl \times m / (m - m_{ap})$$

Martin (1990), Norman et al (2000) e Trebacz (2001) relatam que a densidade óssea avaliada por este método é simples, de fácil execução e baixo custo.

Trebacz (2001) estudou a densidade óssea de membros pélvicos de ratos que estiveram imobilizados por 2 semanas. Avaliou as conseqüências desta imobilização através do Princípio de Arquimedes e conclui que a imobilização diminui os valores de densidade óssea.

### ***Histomorfometria***

A histomorfometria analisa de maneira quantitativa os componentes da morfologia óssea como volume, área, perímetro e espessura. As medidas histomorfométricas podem expressar a quantidade do tecido ósseo e as taxas de formação e reabsorção (SHAW, et al., 1986; ESCRIBANO et al., 1996; NORMAN et al., 2000; HEFFERAN et al., 2003; ALBERTIN, 2004).

As lâminas histológicas são capturadas e programas computacionais especializados permitem, através de ferramentas digitais, as mensurações escolhidas

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Foi objetivo deste trabalho, analisar as alterações densitométricas, histomorfométricas e biomecânicas em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira. Desta maneira foi dividida em 2 estudos que, apresentados na forma de artigos científicos, têm os seguintes objetivos específicos:

### **Artigo 1**

**“Análise Biomecânica em Fêmures de Ratos Submetidos à Ausência de Carga e Atividade Física em Esteira.”<sup>1</sup>**

### **Objetivo Específico**

Analisar a força máxima, rigidez e resiliência do terço médio de fêmures de ratos dos grupos experimentais através do ensaio de flexão em três pontos.

### **Artigo 2**

**“Análise Densitométrica e Histomorfométrica em Fêmures de Ratos Submetidos à Ausência de Carga e Atividade Física em Esteira.”\*\***

### **Objetivo Específico**

Analisar a densidade óssea do terço médio de fêmures dos ratos dos grupos experimentais utilizando os métodos Empuxo e Densitometria Radiográfica e a espessura óssea compacta desta região, através da histomorfometria.

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação.

\*\* A ser encaminhado para revista especializada.

## **ARTIGO 1**

### **Análise Biomecânica em Fêmures de Ratos Submetidos à Ausência de Carga e Atividade Física em Esteira.**



**Análise Biomecânica em Fêmures de Ratos Submetidos à Ausência de Carga e  
Atividade Física em Esteira.\***

Carolina Rubio Vicentini<sup>2,2</sup>, Rossana Abud Cabrera Rosa<sup>3</sup>, Luciana Del Rio Pinoti  
Ciarlini<sup>1</sup>, Paulo Henrique dos Santos<sup>1</sup>, Mário Jefferson Quirino Louzada<sup>1</sup>

**Resumo**

Foi estudada a influência da suspensão, do treinamento físico e da movimentação livre sobre as propriedades mecânicas do osso, força máxima, rigidez e resiliência obtidas a partir de ensaio de flexão em três pontos. Foram utilizados 75 ratos machos, distribuídos em cinco grupos experimentais. Destes, empregou-se dois como controle e três suspensos por 21 dias. Destes Suspensos um grupo foi sacrificado logo após a suspensão, outro foi submetido a período de atividade física em esteira por 21 dias e o terceiro à movimentação livre por 21 dias. A força máxima admitida pelo osso apresentou-se diminuída com a suspensão,  $83,89 \pm 14,36\text{N}$  para CI e  $123,68 \pm 22,97$  para CII, mas com a atividade física em esteira e mesmo com a movimentação livre foram recuperados os valores,  $103,29 \pm 14,32\text{N}$  e  $113,69 \pm 17,01\text{N}$ , respectivamente. A rigidez óssea mostrou-se menor com a suspensão,  $127,2 \pm 29,88 \times 10^{-3}\text{N/m}$ , e os valores dos grupos de atividade física e movimentação livre foram  $190,51 \pm 47,38 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,  $232,37 \pm 48,01 \times 10^{-3}\text{N/m}$ , respectivamente. A resiliência no grupo suspenso foi de  $19,29 \pm 6,97 \times 10^{-2}\text{J}$ , do grupo da atividade física  $24,34 \pm 6,80 \times 10^{-2}\text{J}$ , e para os ossos do grupo da movimentação livre  $22,73 \pm 4,25 \times 10^{-2}\text{J}$ . Os parâmetros biomecânicos não expressam diferenças significativas nos grupos de atividade física em esteira e movimentação livre, já o grupo suspenso apresentou redução nas propriedades mecânicas estudadas.

**Palavra-chave:** ausência de carga; suspensão pela cauda; ratos; osso; ensaio mecânico.

---

<sup>2</sup> Departamento de apoio, produção e Saúde Animal (DAPSA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA)-UNESP-Araçatuba São Paulo (SP.). Rua: Clóvis Pestana, 793 Bairro Dona Amélia - CEP 16050-680 Telefone (18) 3636-3200 R. 3627 – Fax (18) 3622-6487 e-mail: louzada@fmva.unesp.br

<sup>3</sup> Disciplina de Anatomia e fisiologia UniSalesiano-Araçatuba

\* Trabalho submetido à revista Veterinária e Zootécnica e aceito para publicação.

## Introdução

A compressão longitudinal exercida no sistema esquelético é um dos fatores de manutenção do seu metabolismo mineral ósseo. (APPEL, 1990; ASTRAND e RODAHL, 1980 GALANT et al., 1970) Em animais acometidos por traumas, fraturas do terço médio de fêmur, mielopatias degenerativas e luxação coxofemoral, esse metabolismo é prejudicado e, em muitas vezes, esses animais necessitam de aparelhos mecânicos; como órteses, utilizadas nos membros, acometidos para realizarem a marcha. (ALBUQUERQUE SOUZA e TUDURY, 2003) Assim estudos devem ser realizados para compreender o comportamento ósseo em animais impossibilitados de se locomoverem. Um dos modelos que pode ser utilizado para investigar esses acometimentos é a suspensão de ratos pela cauda, simulando ausência de carga ou ambiente de “microgravidade”. (CARVALHO, 2001; KASPER et al.,1990; MUSACCHIA et al., 1980; SILVA, 2002) Vários estudos em fisioterapia veterinária relatam a importância de exercícios físicos em pacientes que permaneceram longos períodos inativos para possibilitar a deambulação. Considerando que na literatura se encontram poucos trabalhos relacionando a indução à inatividade com a realização de atividade física, foi objetivo deste estudo avaliar algumas propriedades mecânicas em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e a treinamento físico em esteira.

## Material e Método

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, foram utilizados para este estudo 75 ratos adultos da raça *Rattus Novegicus albinus*, variedade Wistar, com massa corpórea média de  $261,47 \pm 2,81$  g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba - SP.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, conforme o tipo de tratamento: **CI** - Grupo controle 1, ratos não tratados que permaneceram nas gaiolas por 21 dias e foram eutanasiados; **C II** - Grupo controle 2, ratos não tratados que permaneceram em gaiolas por 42 dias e foram eutanasiados; **S** – Grupo Suspenso, Animais que permaneceram suspensos pela cauda por 21 dias e depois eutanasiados; **SE** - Animais permaneceram suspensos pela cauda por 21 dias e, em seguida, passaram por um período de treinamento físico de 21 dias em esteira e depois eutanasiados e **SL** - Os animais permaneceram suspensos por 21 dias e, em seguida, foram colocados em movimentação livre por 21 dias dentro das gaiolas e depois eutanasiados.

Para o processo de instalação da suspensão, os animais foram anestesiados com inalação de éter. Seguindo os procedimentos de Silva 2002, as caudas foram lavadas com água e detergente e, após a secagem, foi aplicada tintura de Benjoim por toda a pele. Em seguida, as caudas foram envolvidas por espuma adesiva (Reston<sup>®</sup>), desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger a pele e evitar lesões cutâneas. Sobre a espuma adesiva foi aplicada tira elástica adesiva, tensionada homogeneamente, de modo a envolver toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocada uma fita de tecido resistente (cadarço sarjado) a qual foi fixada por tira elástica adesiva e enfaixamentos adicionais de esparadrapo e barbante, de modo a formar uma alça que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão. A conexão ocorreu através de presilha metálica, instalada em um eixo suspenso horizontalmente a 33 cm do piso da gaiola. O acesso à água e a ração foi “ad libitum”.

Para o treinamento físico em esteira, os ratos do grupo SE, foram treinados em esteira motorizada, confeccionada para a realização deste projeto, pelo curso de Engenharia Mecatrônica do Centro Universitário Católico Auxilium-UniSALESINO-Araçatuba. Composta por estrutura metálica de 118,0 cm de comprimento e 46,0 cm de largura, seis baias individuais com altura de 14,0cm, largura interna de 15,0cm e 46,0 cm de comprimento. A estrutura externa era de acrílico de 5,0mm de espessura, e motor que permitia velocidade mínima de 9,0m/min e máxima de 30,0m/min. Durante a atividade física dos ratos na esteira foi seguido protocolo de 21 dias de treinamento, tendo iniciado no dia seguinte ao termino da suspensão, sendo três dias consecutivos de treino e um de descanso. Os exercícios iniciaram com 10 minutos de treinamento e a cada dia eram acrescidos 5 minutos, até perfazer um total de 60 minutos. (NORMAN et al., 2000) As massas corpóreas foram aferidas, utilizando balança eletrônica (Helmac<sup>®</sup>, modelo HM 1000, 0,01g) registradas no primeiro e no fim do experimento. Os grupos SE e SL tiveram suas massas registradas 21 dias pós-suspensão.

Os ratos foram eutanasiados com inalação excessiva de éter. Após o sacrifício, os membros pélvicos foram dissecados e os fêmures direitos retirados e separados das partes moles circundantes. Após a dissecação, os ossos foram identificados, envolvidos em gaze umedecida em soro fisiológico e estocados em “freezer” -20°C. Na ocasião dos ensaios mecânicos, os ossos foram retirados do “freezer” e mantidos em refrigerador comum 24 horas antes do ensaio. Algumas horas antes de serem testados eles foram mantidos em temperatura ambiente, até atingir o equilíbrio térmico.

Para os ensaios mecânicos foi utilizada máquina universal de ensaio EMIC<sup>®</sup>, modelo DL 3000\*, do Departamento de Materiais Dentários da FOA /Unesp-Araçatuba, com carga aplicada a uma velocidade de 5 mm/min. O registro de força e deslocamento foi realizado pelo sistema computacional pertencente à máquina.

Para análise biomecânica foi determinada, através da curva de força X deslocamento (figura 1) a força máxima admitida pelo fêmur, a rigidez (calculada pela inclinação da curva, na fase elástica) e a resiliência (energia absorvida pelo osso no ensaio, calculada pela área sob a curva força x deslocamento) variáveis que expressam características mecânicas do osso tal como resistência óssea. A distância de vão de apoio foi de 20 mm e a célula de carga utilizada foi de 2000 N.

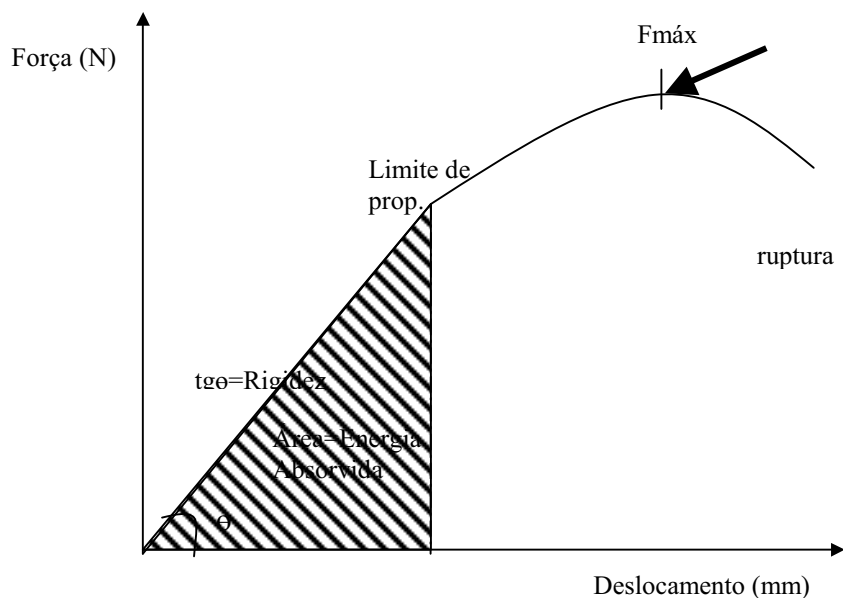


Figura 1 - Desenho esquemático da curva característica, Força x Deslocamento, obtida no ensaio de flexão de três pontos na máquina universal de ensaios EMIC<sup>®</sup>.

Para a massa corporal foi aplicado o teste t de Student pareado para comparar os instantes iniciais e após os 21 dias de suspensão dos grupos S, SE e SL. O teste de *Kruskal-Wallis* analisou a variação da massa corpórea entre os grupos e ANOVA e teste de *Tukey* para comparar os grupos em cada uma das variáveis biomecânicas força máxima, rigidez e resiliência. Em todas as análises foi usado o valor de 5% como nível de significância.

## Resultados

Foram colocados em suspensão 15 animais em todos os grupos, no entanto, dois ratos do grupo 3 morreram, devido a necrose da cauda.

### *Massa Corpórea*

Não houve diferença significativa. ( $P=0,0638$ ) nos valores de massa corpórea nos grupos S, ST e SL. A variação relativa de massa corpórea foi  $8,5 \pm 0,11\%$  para CI,  $9,4 \pm 0,16\%$  para CII,  $-5,6 \pm 0,05\%$  para S,  $36,6 \pm 0,10\%$  para SE e  $34,5 \pm 0,11\%$  para SL (figura 2).

A análise estatística acusou diferença significativa entre os grupos CI-SE, CI-SL, CI-SE, CII-SL, S-SE e S-SL.

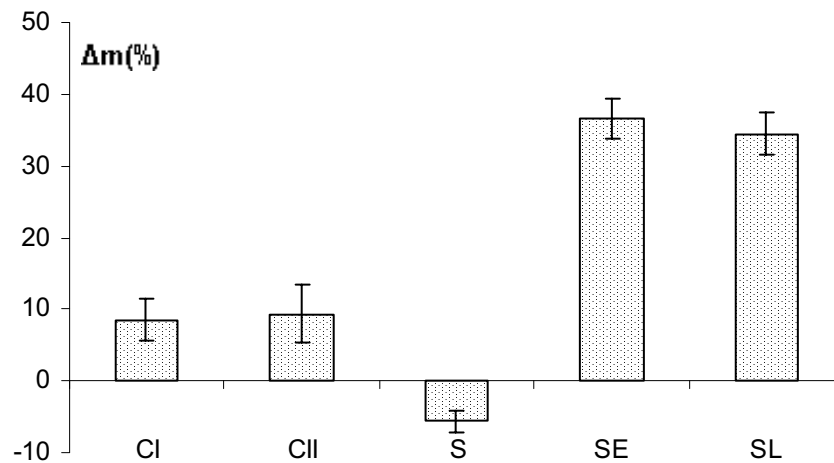


Figura 2 - Valores da média e erro padrão da variação da massa corpórea ( $\Delta m$ ) observados nos ratos dos grupos experimentais CI (controle 21 dias), CII (controle 42 dias), S (21 dias de suspensão), SE (21 dias de suspensão seguidos de 21 dias de treinamento físico em esteira) e SL (21 dias de suspensão seguidos de 21 dias de movimentação livre). Araçatuba – SP, 2006.

### *Força Máxima*

Os valores da força máxima admitida pelo terço médio dos fêmures no ensaio de flexão foram  $116,54 \pm 15,25\text{N}$  para CI,  $123,68 \pm 22,97\text{N}$  para CII,  $83,89 \pm 14,36\text{N}$  para S,  $103,29 \pm 14,32\text{N}$  para SE e  $113,69 \pm 17,01\text{N}$  para SL. Ocorreu diferença significativa entre os grupos CI-S, CII-S e S-SE e S-SL. (Tabela 1).

### *Rigidez*

O valor médio da Rigidez nos ossos do CI foi  $225,3 \pm 26,95 \times 10^3 \text{N/m}$ , nos ossos do CII foi  $256,1 \pm 49,88 \times 10^3 \text{N/m}$ , para o grupo S foi  $127,2 \pm 29,88 \times 10^3 \text{N/m}$ , para os ossos do

SE foi  $190,5 \pm 47,38 \times 10^{-3} \text{N/m}$ , e para os ossos do SL foi  $232,3 \pm 48,01 \times 10^{-3} \text{N/m}$ . A análise estatística acusou diferença significativa entre os grupos CI-S, CII-S, CII-SE, S-SE, S-SL (Tabela 1).

### **Resiliência**

O valor médio da Rigidez para o CI foi  $28,43 \pm 5,41 \times 10^{-2} \text{J}$ , para os ossos do CII foi  $29,83 \pm 4,61 \times 10^{-2} \text{J}$ , para o grupo foi S  $19,29 \pm 6,97 \times 10^{-2} \text{J}$ , para o SE foi  $24,32 \pm 6,80 \times 10^{-2} \text{J}$ , e para o SL foi  $22,73 \pm 4,25 \times 10^{-2} \text{J}$ . A análise estatística acusou diferença significativa entre os grupos CI-S, CII-S e CII-SL (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da média e desvio padrão das propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez ( $10^3 \text{N/m}$ ) e resiliência ( $10^{-3} \text{J}$ ) admitidas pelo terço médio de fêmures direito de ratos através da análise biomecânica flexão em três pontos nos grupos controles e experimentais CI (controle 21 dias), CII (controle 42 dias), S (21 dias de suspensão), SE (21 dias de suspensão seguidos de 21 dias de treinamento físico em esteira) e SL (21 dias de suspensão seguidos de 21 dias de movimentação livre). Araçatuba – SP, 2006.

<b>Grupos</b>	<b>Força Máxima (N)</b>	<b>Rigidez (<math>10^3 \text{N/m}</math>)</b>	<b>Resiliência (<math>10^{-3} \text{J}</math>)</b>
<b>CI</b>	$116,54 \pm 15,25^a$	$225,30 \pm 26,95^{a,b}$	$28,44 \pm 5,41^{a,b}$
<b>CII</b>	$123,68 \pm 22,97^a$	$256,16 \pm 49,88^a$	$29,84 \pm 4,61^a$
<b>S</b>	$83,89 \pm 14,37^b$	$127,29 \pm 29,88^c$	$19,29 \pm 6,97^c$
<b>SE</b>	$103,30 \pm 14,32^a$	$190,51 \pm 47,38^b$	$24,34 \pm 6,80^{a,b,c}$
<b>SL</b>	$113,69 \pm 17,01^a$	$232,37 \pm 48,01^{a,b}$	$22,73 \pm 4,25^{b,c}$

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

### **Discussão**

O modelo de suspensão de ratos pela cauda, mantendo seus membros pélvicos em ausência de carga, vem sendo utilizado em medicina humana, visando compreender a perda de massa óssea e muscular em pacientes que permaneceram acamados, e também em pesquisas relacionadas com a permanência de astronautas no espaço, por períodos prolongados. (KASPER et al., 1990, SILVA, 2002) Essas pesquisas são úteis para determinar medidas de prevenção ou tratamento da osteopenia, não somente nos

astronautas e em pacientes que não realizam a descarga de peso nos membros inferiores (COWIN, 1998; STHLE, 1998), mas também em medicina veterinária, em animais acometidos por fraturas, luxação, traumatismos em coluna vertebral e aqueles impossibilitados de locomoção (FETTER et al., 2004).

Os animais selecionados para o presente trabalho foram ratos adultos, com massa corporal média de 261,19g, considerada adequada para o tamanho da gaiola e para o sistema de suspensão. O tamanho do fêmur facilitou a manipulação e o desenvolvimento dos ensaios biomecânicos. A fácil obtenção, manipulação e adaptação aos protocolos de pesquisa contribuíram para a escolha desse animal.

Os resultados referentes à variação da massa corpórea demonstraram que os ratos não tiveram um estresse importante, pois não se obteve diferença significativa dos grupos controles em relação ao S. Estes valores concordam com os resultados dos seguintes autores Desplanches et al. (1987), Morey-Holton e Globus (1998), Norman et al. (2000) e Trebacz (2001). Estudos relatam que nos primeiros sete dias de suspensão os animais apresentaram maior perda de massa corpórea em relação ao 14º e 21º dias de suspensão, sugerindo um estresse inicial e uma adaptação ao sistema de suspensão no final do 14º e 21º dia experimental (DESPLANCHES et al., 1987; MOREY-HOLTON e GLOBUS, 1998; SILVA, 2002).

Neste estudo avaliamos a massa corporal somente no 1º e no 21º dia de suspensão, observamos menor movimentação e consumo de água e ração nos animais suspensos nos primeiros dias de experimento. Comparando os valores iniciais e finais da massa corpórea dos grupos que permaneceram em suspensão (S, SE e ST), não ocorreram diferenças significativas entre os valores, concordando com os estudos de Norman et al. (2000).

Analisando a variação relativa de massa corpórea do CII com os grupos SE e SL (treinamento em esteira e movimentação livre, respectivamente) observou-se diferença significativa entre eles, com acréscimo de massa corpórea nos grupos SE e SL, provavelmente devido à recuperação pós-suspensão. Esses resultados contrariam os encontrados nos estudos de Frateschi (2002) que ao comparar a massa corpórea de ratos imobilizados e treinados com ratos imobilizados e não treinados não verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em medicina veterinária, assim como na medicina e odontologia humana, avaliar a quantidade de densidade mineral óssea é de fundamental importância, principalmente, para relacionar estes resultados com a fragilidade e conseqüentes lesões ósseas (PRADO

FILHO; STERMAN, 2004). Assim, este trabalho analisou as propriedades mecânicas de ossos, quando submetidos a ensaio de flexão de três pontos, de animais que passaram por um período de suspensão e atividade física em esteira.

Para avaliar a alteração da resistência óssea, as variáveis eleitas foram: força máxima admitida, a rigidez e a resiliência. Carvalho, em 2001, relatou, em seus estudos, a escolha pelo ensaio por ser simples e de fácil realização, sendo suficiente para as análises propostas. Para a realização deste ensaio, foi aplicada uma carga de força com velocidade de 5 mm/min, com distância do vão de apoio de 20 mm. A velocidade e a distância do apoio variam de acordo com o tamanho do material biológico utilizado, assim, Trebacz (2001) relata que empregou uma carga aplicada de 2 mm/min e distância de vão de apoio usada foi de 15 mm, devido ao tamanho do material utilizado. Já Silva (2002) utilizou em seus estudos uma velocidade de 0,25mm/mim e a distância entre os pontos de 2,5mm.

Os resultados dos ensaios mecânicos de força máxima admitida demonstraram que a suspensão pela cauda provocou maior fragilidade óssea, quando comparado aos grupos controles e aos grupos de treinamento físico e movimentação livre. Com relação aos grupos SE e SL, esperava-se diferença significativa entre o efeito do tratamento físico e movimentação livre, no entanto, os valores apresentados demonstraram recuperação da massa óssea diminuída tanto pelo exercício quanto pela movimentação livre.

Nos estudos de Frateschi (2002), ratos imobilizados por 21 dias apresentaram menor resistência óssea em relação ao seu controle. Neste estudo o grupo controle de 42 dias também demonstrou menor força em relação aos animais que permaneceram 21 dias imobilizados seguidos de atividade física e movimentação livre. Assim, os resultados citados mostraram que a resistência do osso ficou diminuída com a imobilização e aumentada com o treinamento e movimentação livre, restaurando assim no osso, os valores das propriedades mecânicas que foram estatisticamente iguais aos dos grupos controles.

Silva (2002) relatou que 21 dias de suspensão também foram suficientes para provocar importantes alterações na força máxima e rigidez óssea.

A rigidez ficou diminuída com a suspensão e aumentada nos ossos dos grupos de treinamento na esteira, movimentação livre, controle de 21 dias e controle de 42 dias, estando de acordo com Carter e Hayes (1977), Evans e Vicentelli (1969), Frateschi (2002), Galante et al. (1970), Martin e Boardman (1993) e Silva (2002).



A rigidez foi significativamente diferente entre os grupos CII e o SE, demonstrando a recuperação da massa óssea com o treinamento físico. Já em relação aos grupos CII e ao SL, não houve diferença estatisticamente significativa. Não ocorreu diferença entre o grupo SE e SL, mostrando que tanto a atividade física quanto a movimentação livre recuperaram os valores.

Os resultados referentes à resiliência demonstraram que os valores do grupo suspenso(S) foram menores que o grupo controle de 21 dias (CI), mostrando que o grupo S foi capaz de absorver menos energia que os demais. Entre o grupo suspenso (S) e os grupos de atividade física (SE) e movimentação livre (SL), os valores das médias apresentou - se maior, porém não significativos, evidenciando recuperação parcial desta propriedade mecânica. Ocorreu diferença significativa entre o controle de 42 dias (CII) com o grupo que permaneceu 21 dias suspenso seguido de 21 de movimentação livre (SL). No entanto, não ocorreu diferença entre os grupos SE e SL. As médias mostraram que o grupo suspenso ficou com valores menores que os grupos CI, CII, SE, e SL, concordando com Kaneps et al.(1997) que relatam a perda e degradação das propriedades mecânicas pós – período de suspensão, já que resulta na perda do tecido ósseo. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de Frateschi (2002) já que a imobilização também se apresentou com valores menores nos grupos controle de 21 e 42 dias, imobilização seguida de trabalho físico e movimentação livre.

Os resultados das médias apresentados no ensaio biomecânico, flexão em três pontos nas variáveis estudadas, força máxima admitida pelo osso, rigidez e resiliência sugeriram que não há diferença significativa entre o treinamento físico em esteira e a movimentação livre. Esses dados são de extrema importância aos profissionais da saúde humana e veterinária que trabalham na reabilitação de pacientes acometidos em situações que levam a uma ausência total ou parcial de carga em seus membros.

### **Conclusão**

A suspensão de ratos pela cauda provocou reduções importantes nos valores de propriedades mecânicas do osso, o treinamento físico em esteira e a movimentação livre não promoveram diferença significativa nos parâmetros biomecânicos estudados.

## Referências

- ALBUQUERQUE SOUZA, A. F.; TUDURY, E. A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico – revisão. **Rev. Clín. Vet.**, v.8, n.47, p 54-66, 2003.
- APPEL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. a review: **Sports Med.**, v.10, n.1, p. 42-58, 1990.
- ASTRAND, P.O.; RODAHL, K. **Tratado de fisiologia do exercício**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, p.246-252, 1980.
- CARTER, D.R.; HAYES, W. The compressive behavior of bone as a two phase porous structure. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v.59, n.7, p-954-962, 1977.
- CARVALHO, C.M.M. **Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético**. 2001. 61f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.
- COWIN, S.C. On Mechanosensation in bone under microgravity. **Bone**, v.22, Suppl.5, p.119S-125S, 1998.
- DESPLANCHES, D.; et al., R. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.63, n.2, p.558-563, 1987.
- EVANS, F.G.; VINCENELLI, R. Relation of collagen fiber orientation to some mechanical properties of human cortical bone. **J. Biomech.**, v.2, n.1, p.63-71, 1969.
- FETTER, A.W.; SIEMERING, G.H.; RISER W.H. Osteoporosis and Osteopetrosis. Disponível in < [http:// www.ivis.org](http://www.ivis.org): B0056. 0685> acesso em 14 Jun. 2004.
- FRATESCHI, M.E.B.J.M. **Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso**. 2002. 71f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- GALANTE, J.; ROSTOKER, W.; RAY, R.D. Physical properties of trabecular bone. **Calcif. Tissue Res.**, v.5, n.3, p.236-246, 1970.
- KANEPS, A. J.; STOVER, S.M; LANE, N.E. Changes in canine cortical and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise. **Bone.**, v.21, n.5, p. 419-423, 1997.
- KASPER, C.E.; WHITE, T.P; MAXWELL, L.C. Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. **J. Appl. Physiol.**, v.68, n.2, p.533-539, 1990.
- MARTIN, R.B.; BOARDMAN, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. **J. Biomech.**, v.26, n.9, p. 1047-1054, 1993.
- MOREY-HOLTON, E.R.; GLOBUS, R.K. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. **Bone**, v.22, suppl.5, p.83S-88S, 1998.

MUSACCHIA, XJ; et al., A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. **J. Appl. Physiol.**, v.48, n.3, p.479-486, 1980.

NORMAN, T.L.; et al., Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviat. Space. Environ. Med.**, v. 71, n. 6, p. 593-598, 2000.

PRADO FILHO, J.R.C.; STERMAN, F.A. Evaluation of mineral bone density in thoroughbred horses under an initial training programme. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, n. 6, p. 384-388, 2004.

SILVA, A.V. **Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato.** 2002. 71f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2002.

STEHLE, P. Summary of research issues in the animal model. **Bone**, v.22, Suppl.5 p. 101S-102S, May. 1998.

TREBACZ, H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. **J. Biomech.**, v.34, n.12, p.1631-1636, 2001.

## **ARTIGO 2**

### **Análise Densitométrica e Histomorfométrica em Fêmures de Ratos Submetidos à Ausência de Carga e Atividade Física em Esteira**

**Análise Densitométrica e Histomorfométrica em Fêmures de Ratos Submetidos  
à Ausência de Carga e Atividade Física em Esteira**

Carolina Rubio Vicentini<sup>4,5</sup>, Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini<sup>1</sup>, Mário Jefferson Quirino  
Louzada<sup>1</sup>

**Resumo**

O ambiente desprovido de estímulos mecânicos resultará em alterações na manutenção do metabolismo mineral normal dos ossos. O propósito deste estudo foi avaliar a influência da suspensão, do treinamento físico e da movimentação livre em ratos através da Densidade Óssea e da Histomorfometria. Para a avaliação da Densidade Óssea foi utilizado a Densitometria Radiográfica (DR) e o Princípio de Arquimedes – Empuxo. Foram utilizados 75 ratos machos, distribuídos em 5 grupos experimentais. Dois grupos foram controles e três experimentais. Os animais do grupo CI permaneceram por 21 dias em caixas próprias para animais de laboratório, e serviram de controle para o grupo S onde os animais permaneceram suspensos por 21 dias. O grupo CII controle 42 dias, serviu de comparação para os animais dos grupos SE (suspensão, seguida de atividade física em esteira) e animais do grupo SL (suspensão seguida de movimentação livre em esteira). Na DR a densidade óssea mostrou-se diminuída com a suspensão,  $1,103 \pm 0,250$  mmAl, ocorreu aumento desses valores com o treinamento em esteira,  $1,647 \pm 0,285$ , e com a movimentação livre,  $1,503 \pm 0,292$  mmAl. Não ocorreu diferença significativa entre realizar atividade física em esteira e movimentar-se livremente na gaiola. A suspensão pela cauda também provocou diminuição,  $1,423 \pm 0,049$  g/cm<sup>3</sup>, nos valores de densidade óssea quando analisadas pelo método do Empuxo. A atividade física em esteira e a movimentação livre aumentaram esses valores, no entanto realizar atividade

<sup>4</sup> Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA)-UNESP-Araçatuba São Paulo (SP.). Rua: Clóvis Pestana, 793 Bairro Dona Amélia - CEP 16050-680 Telefone (18) 3636-3200 R. 3627 – Fax (18) 3622-6487 e-mail: louzada@fmva.unesp.br

<sup>5</sup> Disciplina de Anatomia e Fisiologia UniSalesiano-Araçatuba

física foi mais eficiente que movimentar-se livremente. Em relação à histomorfometria não ocorreu diferença entre os grupos.

**Palavra-chave:** Densidade óssea ; suspensão pela cauda; ratos; osso; histomorfometria

## **Introdução**

O crescimento e desenvolvimento ósseo são processos fisiológicos que ocorrem no indivíduo desde o início da vida intra-uterina e prolongam-se até a idade adulta. Os processos de formação e mineralização óssea são eventos que apresentam altas taxas metabólicas e, por ocorrerem durante longo período de tempo, estão sujeitos à influência de fatores intrínsecos e fatores extrínsecos. (APPEL, 1990) Um dos fatores responsáveis pela manutenção do metabolismo mineral normal dos ossos é a compressão longitudinal exercida sobre eles. Esta pressão estimula o crescimento ósseo por oposição. A descarga da massa corpórea resulta em maior espessura do osso e maior densidade da diáfise (ASTRAND & RODAHL, 1980; GALANT et al., 1970). Contudo exposição a ambientes que induzem o esqueleto humano a ausência de carga (descarregamento mecânico) modifica o metabolismo ósseo-muscular. De acordo com Vico, 1998 as características físicas do tecido podem variar consideravelmente por depender diretamente da carga que este tecido está submetido. Em pacientes acamados, imobilizados, e com restrições à deambulação e ainda em astronautas no espaço o metabolismo ósseo será modificado devido à ausência de descarga da massa corpórea, situação que propiciará a instalação da osteopenia, e poderá resultar em fraturas. Holick (1998) relata que astronautas expostos à microgravidade e pacientes que permaneceram acamados tiveram perda de massa óssea semelhantes, da ordem de 1 a 5%.

A remodelação óssea é sensível às forças mecânicas geradas no osso durante a atividade física normal, podem estimular a osteogênese e suprir as alterações causadas pela ausência de carga (SILVA, 2002). O exercício físico é indicado com o intuito de amenizar ou prevenir a atrofia muscular e a perda de massa óssea (NORMAM et al., 2000; YEH et al., 1993; TUUKKANEN & VÄÄNÄNEM, 1994; SHIMANO, 2006). Submeter animais à condição de ausência de carga, através de sua suspensão pela cauda,

e submetê-los à atividade física após o período de hipocinesia tem sido de grande importância na elaboração de propostas de avaliação e estudos para a prevenção e/ou tratamento de osteopenia. Assim, foi proposta deste estudo realizar análises densitométricas e histomorfométricas em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e a treinamento físico em esteira.

## **Material e Método**

### ***Animais***

Com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, foram utilizados setenta e cinco ratos adultos, da raça *Rattus Novegicus albinus*, variedade Wistar, com massa corpórea média de  $261,47 \pm 2,81$ g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba - SP.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, conforme o tipo de tratamento: **CI** - Grupo controle 1, ratos não tratados que permaneceram nas gaiolas (com cinco animais) por 21 dias e foram sacrificados; **CII** - Grupo controle 2, ratos não tratados que permaneceram em gaiolas (com cinco animais) por 42 dias e foram sacrificados; **S** – Grupo Suspenso, Animais que permaneceram suspensos pela cauda por 21 dias e depois sacrificados; **SE** - Animais permaneceram suspensos pela cauda por 21 dias e, em seguida, passaram por um período de treinamento físico de 21 dias em esteira e depois sacrificados e **SL** - Os animais permaneceram suspensos por 21 dias e, em seguida, foram colocados em movimentação livre por 21 dias dentro das gaiolas e depois sacrificados.



### ***Procedimentos para Suspensão***

Para o processo de instalação da suspensão, os animais foram anestesiados por inalação de éter. Seguindo os procedimentos de Silva, 2002 suas caudas foram lavadas com água e detergente e, após a secagem, foi aplicada tintura de Benjoim por toda a pele. Em seguida, as caudas foram envolvidas por espuma adesiva (Reston<sup>®</sup>), desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger a pele e evitar lesões cutâneas. Sobre a espuma adesiva foi aplicada tira elástica adesiva Coban<sup>®</sup> (modelo 1582 da marca 3M<sup>®</sup>), tensionada homogeneamente, de modo a envolver toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocada uma fita de tecido resistente (cadarço sarjado) a qual foi fixada por tira elástica adesiva e enfaixamentos adicionais de esparadrapo e barbante, de modo a formar uma alça que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão. A conexão ocorreu por meio de presilha metálica, instalada em um eixo suspenso horizontalmente a 33 cm do piso da gaiola.

O acesso à água e a ração (Rações e Concentrados Primor<sup>®</sup>) foi à vontade.

### ***Treinamento Físico***

Para o treinamento físico dos ratos do grupo SE, uma esteira motorizada foi confeccionada especialmente para este projeto pelo curso de Engenharia Mecatrônica do Centro Universitário Católico Auxilium-UniSALESINO-Araçatuba. A esteira foi composta por estrutura metálica de 118,0cm de comprimento e 46,0cm de largura, seis baias individuais com altura de 14,0cm, largura interna de 15,0cm e 46,0cm de comprimento. A estrutura externa era de acrílico de 5,0mm de espessura e foi utilizado um motor elétrico que permitia uma variação de velocidade de 0,15m/s a 0,5m/s. Neste experimento utilizou-se velocidade de 0,45m/s. Para a atividade física dos ratos na esteira foi seguido o protocolo utilizado por Norman et al., 2000. Foi seguido protocolo de 21

dias de treinamento, tendo iniciado no dia seguinte ao término da suspensão, sendo três dias consecutivos de treino e um de descanso. Os exercícios iniciaram com dez minutos de treinamento e a cada dia eram acrescidos cinco minutos, até perfazer um total de sessenta minutos (Quadro 1).

Quadro 1. Esquema dos dias e periodização do treinamento

Dias	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Tempo de treinamento (Minutos)	Δ	10	15	20	*	25	30	35	*	40	45	50	*	55	60	60	*	60	60	60	*	60	Ø

Δ Último dia de suspensão, \* descanso dos animais, Ø eutanásia dos animais.

### ***Obtenção do Material Biológico***

Os ratos foram sacrificados com inalação excessiva de éter. Após o sacrifício, os membros posteriores foram dissecados e os fêmures direitos retirados e separados das partes moles circundantes. Após a dissecação, os ossos foram identificados, envolvidos em gaze umedecida em soro fisiológico e armazenados em “freezer”  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na ocasião dos ensaios mecânicos, os ossos foram retirados do “freezer” e mantidos em refrigerador comum vinte e quatro horas antes do ensaio. Algumas horas antes de serem testados, os ossos foram mantidos em temperatura ambiente até atingir o equilíbrio térmico.

### ***Densitometria Óssea***

Para as análises de densidade óssea foram utilizadas duas metodologias: a) forma indireta, através da Densitometria Radiográfica (DR); b) forma direta, utilizando o “Princípio de Arquimedes” (Empuxo). Para a DR foram obtidas imagens radiográficas por meio do aparelho de raios X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 60 Kvp, 8mA, 0,2 segundos. À distância foco-filme foi de 20 cm, com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto. As imagens digitais dos fêmures

direito foram obtidas através da placa óptica do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Sobre cada placa óptica foram colocados os fêmures, uma escada de alumínio e a identificação. Esta escada é um referencial densitométrico, de 9 degraus, cada degrau com  $5 \times 25 \text{mm}^2$  de área (liga 6063, ABNT).

As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora, e as imagens manipuladas no software Digora for Windows 1.51. As análises de densidade radiográfica foram realizadas no terço médio da região diafisária. Foi padronizada a área de  $20 \times 70$  pixels para a leitura tanto no terço médio do fêmur quanto na escada de alumínio. Seleccionada a área, o programa apresentava a respectiva densidade radiográfica. Foram efetuadas cinco repetições de medidas em cada radiografia e calculadas as médias dessas repetições, correspondendo assim à densidade radiográfica do osso. Estes valores estavam expressos em níveis de cinza (de 0 a 256 tons) e convertidos em milímetros de alumínio (mmAl) através de equações obtidas pelo gráfico de dispersão relacionando os valores de densidade radiográfica de cada degrau de alumínio e sua espessura correspondente, conforme descrito por Louzada et al., (1998). A equação de cada item foi obtida a partir de três valores do gráfico: o valor da radiopacidade do degrau de alumínio mais próximo ao da radiopacidade do item, o degrau acima e o degrau abaixo. Para cada imagem radiográfica foi feito um gráfico de dispersão (Figura 1).

O cálculo da densidade pelo Princípio de Arquimedes foi feito com auxílio de balança de precisão, onde foram medidas as massas frescas dos fêmures ( $m$ ) e, depois, quando estes estavam submersos em água destilada ( $m_s$ ). Os valores foram utilizados na seguinte expressão matemática:  $d_c = d_l \times m / (m - m_s)$ , onde:  $d_c$  = densidade do corpo;  $d_l$  = densidade da água destilada ( $1 \text{g/cm}^3$ ).

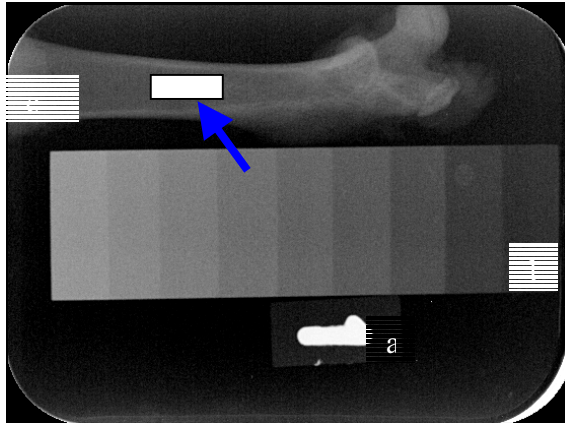


Figura 1. Imagem obtida pelo sistema digital Digora, onde se observa a identificação (a), a escada de alumínio utilizada como referência densitométrica (b), o fêmur (c) e a seta indicou a região onde foram realizadas as análises densitométricas.

### *Histomorfometria*

Para a análise histomorfométrica os fêmures foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado, Fluka<sup>®</sup>, em seguida foram descalcificados em EDTA<sup>6</sup> 10%, e processados no auto-processador Shandon Elliott<sup>®</sup>, modelo Duplex Processor, durante 13 horas, seguindo uma escala formol, álcool, xilol e parafina até atingirem o ponto de corte; a seguir, foram incluídos em parafina<sup>7</sup>, por meio do auto inclusor, Reichert-Jung<sup>®</sup>, modelo 8044, posteriormente foram realizados cortes histológicos com espessura de 4 $\mu$ m (micrômetros) na região do terço médio por meio do micrótomo American Optical<sup>®</sup>, modelo 820. Os cortes foram corados com hematoxilina (7 min.) e eosina (1 min.). As lâminas foram analisadas em microscópio Leica<sup>®</sup>, modelo DMLS, objetiva 5x. Como não era visualizado todo o corte histológico, foram capturadas duas imagens deste, e a espessura de cada parte determinada como apresentada na Figura 2. Estas imagens foram capturadas com auxílio do sistema computacional de análises de imagens Leica IM50<sup>®</sup>,

<sup>6</sup> CRQ – Cromato Produtos Químicos

<sup>7</sup> Alkimia<sup>®</sup>

importadas para um computador para análises pertinentes, através do programa Image-Pro Plus<sup>®</sup>, versão 4.5. O programa utilizado para esta análise foi o Image Tool<sup>®</sup>, versão 3.0.

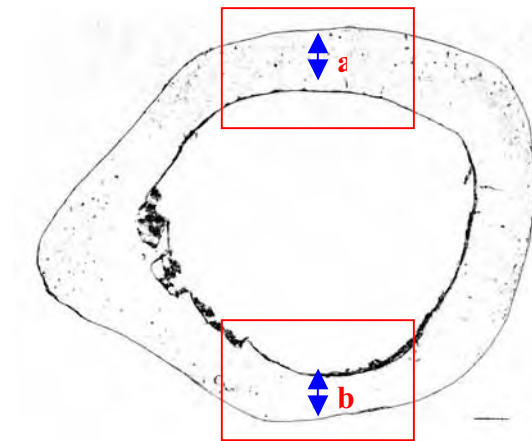


Figura 2 Esquema do corte histológico do fêmur de rato. Os retângulos destacam a região capturada pelo programa computacional. A espessura total do osso compacto da região diafisária foi obtida através da soma de **a + b**.

### ***Análise Estatística***

ANOVA e teste de *Tukey* foram utilizados para comparar os grupos em cada uma das variáveis estudadas. Em todas as análises foi usado o valor de 5% como nível de significância.

### **Resultados**

Dos 15 animais colocados em suspensão, dois morreram como consequência de necrose da cauda.

**Densidade Óssea****Densitometria Radiográfica (DR)**

As médias e desvios padrão das densidades, pela densitometria radiográfica, no terço médio dos fêmures foram: 1,569±0,402 mmAl, para CI; 1,520±0,209 mmAl, para CII; 1,103±0,250 mmAl, para S; 1,647±0,285 mmAl, para SE e, 1,503±0,292 mmAl, para SL. Ocorreu diferença significativa entre os grupos CI-S, CII-S, S-SE e S-SL (Tabela 1).

**Princípio de Arquimedes (Empuxo)**

As médias e desvios padrão das densidades, pelo Princípio de Arquimedes, nos ossos dos grupos foram: 1,34±0,037 g/cm<sup>3</sup>, para CI, 1,345±0,029 g/cm<sup>3</sup> para CII, 1,260±0,057 g/cm<sup>3</sup> para S, 1,423±0,049 g/cm<sup>3</sup>, para SE e 1,327±0,054 g/cm<sup>3</sup> para SL. A análise estatística acusou diferença significativa entre os grupos CI-S, CI-SE, CII-SE, S-SE, S-SL e SE-SL. (Tabela 1)

Tabela 1. Valores de densidade óssea (média±DP) no terço médio dos fêmures direito de ratos, obtidos pela DR e Empuxo nos grupos experimentais.

<b>Densidade Óssea</b>					
<b>Método</b>	<b>CI</b>	<b>CII</b>	<b>S</b>	<b>SE</b>	<b>SL</b>
<b>DR</b>					
(mmAl)	1,569±0,402 <sup>a</sup>	1,520±0,209 <sup>a</sup>	1,103±0,250 <sup>b</sup>	1,647±0,285 <sup>a</sup>	1,503±0,292 <sup>a</sup>
<b>Empuxo</b>					
(g/cm <sup>3</sup> )	1,340±0,037 <sup>b</sup>	1,345±0,029 <sup>b</sup>	1,260±0,057 <sup>c</sup>	1,423±0,049 <sup>a</sup>	1,327±0,054 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P > 0,05).

### Histomorfometria

A tabela 2 apresenta os valores das espessuras na diáfise femoral dos ratos dos grupos estudados, nos locais previamente determinados.

Na Tabela 3 estão os valores da espessura total, (média±DP), da parte óssea compacta dos grupos estudados. A espessura para o grupo CI foi 649,71±35,35µm, para o CII foi 641,05±51,02µm, 308,65±144,48µm no grupo S, 308,07±85,71µm, para o SE e 322,55±57,97µm para o SL. A análise estatística não acusou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Valores de espessura (a e b) obtidos no terço médio de fêmures de ratos nos grupos CI, CII, S, SE e SL.

Animais	CI		CII		S		SE		SL	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1	312,81	318,75	325,96	329,01	141,11	249,03	250,40	227,56	318,00	382,36
2	303,76	307,98	-	-	†	†	300,03	307,29	365,77	384,26
3	358,35	335,19	320,47	311,65	194,464	473,55	275,33	250,44	336,84	288,62
4	310,27	296,68	391,48	355,32	231,308	201,28	318,31	312,94	351,87	350,05
5	328,12	321,94	335,26	287,50	†	†	330,95	330,81	305,27	301,84
6	309,48	291,06	355,56	325,01	264,78	305,74	296,60	288,59	296,48	324,42
7	333,53	343,90	277,78	291,67	340,95	346,67	346,39	312,20	273,37	277,72
8	352,30	342,96	300,38	339,05	369,61	352,93	313,45	338,45	321,80	309,04
9	348,88	339,02	306,97	331,20			270,66	261,47	362,70	343,62
10	351,57	312,08	334,69	335,34	361,64	516,81	413,70	390,80	300,15	348,26
11	356,07	323,48	-	-	336,66	284,16	-	-	286,19	271,40
12	327,47	309,69	334,28	303,76	284,71	395,98	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	390,80	319,47	-	-
14	-	-	-	-	-	-	337,01	353,35	359,62	292,26
15	326,22	284,58	286,89	272,30	231,24	290,40	282,39	258,07	330,49	303,86
<b>Média</b>	<b>332,21</b>	<b>317,48</b>	<b>324,52</b>	<b>316,52</b>	<b>275,64</b>	<b>341,65</b>	<b>317,38</b>	<b>303,95</b>	<b>323,73</b>	<b>321,36</b>
<b>DP</b>	<b>19,51</b>	<b>19,52</b>	<b>32,04</b>	<b>25,32</b>	<b>76,76</b>	<b>98,14</b>	<b>46,98</b>	<b>45,77</b>	<b>30,55</b>	<b>37,51</b>

(†) morte dos animais; (-) dados não analisados.

Tabela 3. Valores da (média±DP) da espessura total da parte óssea compacta do terço médio de fêmures direito de ratos nos grupos CI, CII, S, SE e SL.

	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>1</sup></b>				
	<b>CI</b>	<b>CII</b>	<b>S</b>	<b>SE</b>	<b>SL</b>
<b>Média</b>	<b>649,71</b>	<b>641,05</b>	<b>617,30</b>	<b>621,35</b>	<b>645,10</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>35,35</b>	<b>51,02</b>	<b>144,48</b>	<b>85,71</b>	<b>57,97</b>

(<sup>1</sup>) Não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Na Figura 4 estão mostradas imagens das lâminas histológicas onde foram realizadas as medidas de espessura. Os valores indicaram uma diferença acentuada entre as espessuras dos lados do grupo S, como pode ser observado na figura.



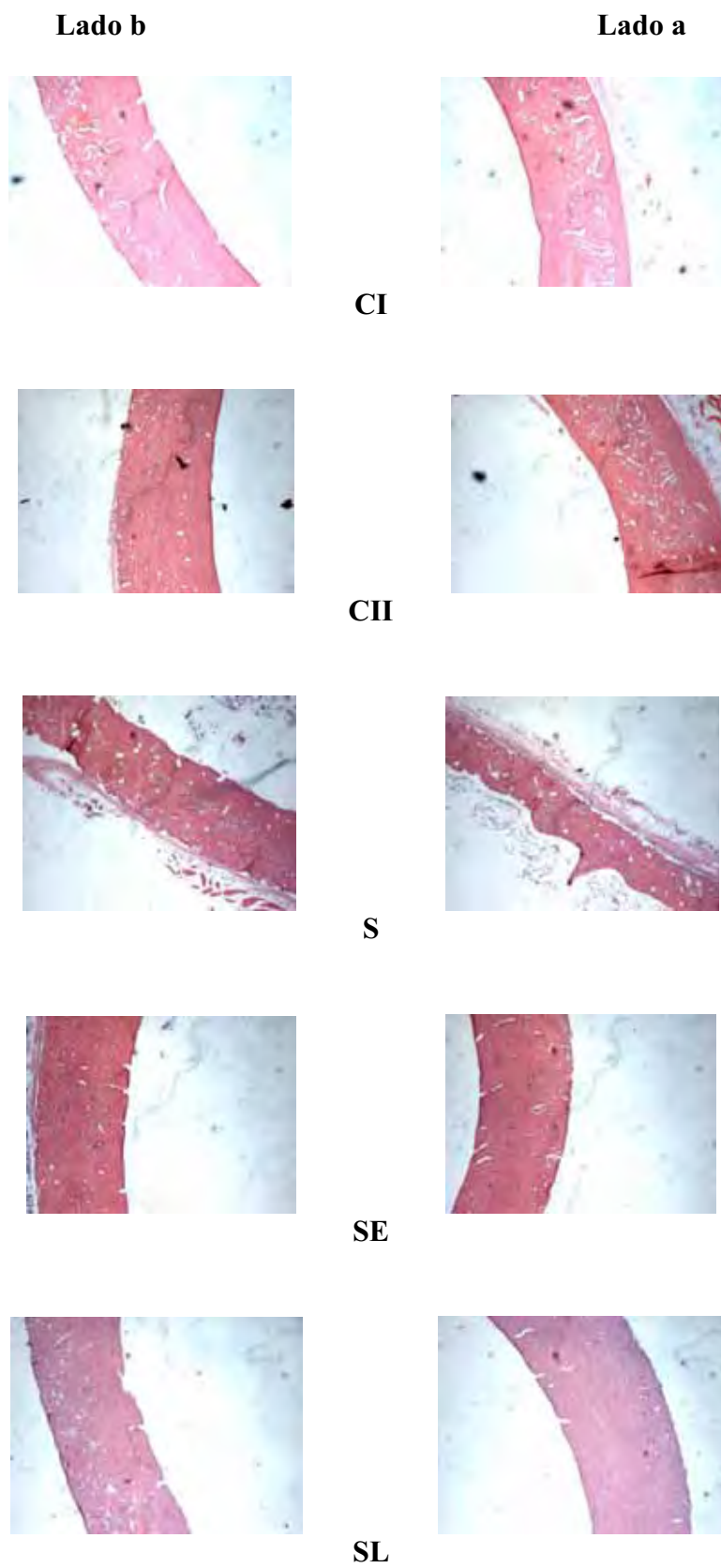


Figura 4. Imagens das lâminas histológicas, aumento 5x, mostrando a região onde foram feitas as medidas das espessuras ósseas. Os cortes foram corados com HE.

## Discussão

Inúmeros estudos sobre as alterações dos sistemas ósseo e muscular relacionados à atrofia óssea e muscular vêm sendo realizados. Essas pesquisas tomaram destaque quando se procurou compreender melhor as modificações orgânicas em astronautas que permaneciam em ambiente de baixa gravidade, no espaço, por períodos prolongados, situação que evidencia perda significativa da massa e da densidade mineral óssea (KASPER et al., 1990; SILVA, 2002; COWIN, 1998; STHLE, 1998). Em indivíduos que permanecem acamados por longos períodos e/ou ainda em situações que os levam a restrição da atividade física, essas pesquisas podem ser úteis para determinar medidas de prevenção ou tratamento da osteopenia instalada. O modelo experimental rato suspenso pela cauda, aceito desde a década de setenta pela NASA ("National Aeronautics and Space Administration"), a Agência Espacial Norte Americana, é metodologia utilizada para simular ambiente de ausência de carga causando alterações ósseas e musculares. (MOREY, 1979; KASPER et al., 1993; MOREY-HOLTON e GLOBUS, 1998; NORMAN et al., 2000; MOREY-HOLTON e GLOBUS, 2002; SILVA e VOLPON, 2004).

O modelo de suspensão pela cauda utilizado neste estudo promoveu fácil adaptação dos animais ao sistema de fixação, não apresentando diminuição significativa de massa corpórea nem alterações comportamentais. Contudo dois animais do grupo S (suspenso) morreram no decorrer do estudo, e isto pode ter sido por necrose da cauda. A amputação da cauda seguiu o mesmo protocolo utilizado nos trabalhos de Norman et al. (2000), Lara (2003), Silva e Volpon (2004), que não relataram perdas de animais em seus estudos por esse motivo.

Para a recuperação da atrofia óssea induzida pela ausência de carga, foi realizado treinamento físico em esteira, seguindo estabelecido por Norman et al. (2000).

Dentre os vários protocolos existentes (SHAW, et al., 1987; TUNG-FU et. al., 2004; FLUCKEY, et al, 2002; VAN DER WIEL et al., 1995), a opção por este se deu por preconizar dias de treinamentos seguidos por dia de não treinamento (descanso), evitando fadiga muscular e danos relacionados com o excesso de treinamento. Durante a execução deste protocolo alguns animais resistiram ao treinamento e, por este motivo, foram excluídos do estudo.

Para a avaliação da densidade óssea, utilizamos a densitometria radiográfica (DR), que, segundo Louzada (1998) é metodologia capaz de avaliar variações de massa óssea com excelente precisão e baixo custo, o que faz esta técnica promissora em aplicações clínica e experimental. A metodologia utilizando o sistema digital Digora mostrou-se propícia, principalmente pelas dimensões da região estudada. Esse método de avaliação é amplamente utilizado em estudos odontológicos (SOUZA et al., 2004).

Ao comparar o grupo CI com o grupo S, observamos diferença significativa nos valores, ou seja, a suspensão por 21 dias foi suficiente para provocar diminuição da densidade óssea. Também ocorreu diferença significativa entre o grupo S em relação aos grupos SE e SL, mostrando que o treinamento físico em esteira e a movimentação livre proporcionaram um aumento efetivo da densidade óssea.

O fato de não ter ocorrido diferença significativa entre o CII em relação aos grupos SE e SL demonstra que tanto o exercício físico em esteira quanto a movimentação livre foram eficientes para recuperar a densidade óssea a níveis normais.

Ao se comparar o grupo SE com o grupo SL não encontramos diferenças estatísticas, aparentando que fazer atividade física em esteira ou movimentar-se livremente não traz diferenças significativas. Estes resultados não corroboram com a “esperada” eficiência preconizada pelo uso do treinamento físico em esteira. As causas para esta igualdade nos resultados não estão evidentes. O treinamento físico em esteira

por 21 dias, a velocidade, a duração da atividade física e ainda a não inclinação da esteira são fatores que podem ter contribuído com esses resultados. Por outro lado, os animais do grupo SL podem ter adquirido densidade óssea semelhante ao SE por estarem em gaiolas individuais e amplas que permitiram uma maior atividade.

Infelizmente os resultados encontrados não puderam ser confrontados na literatura, uma vez que não encontramos trabalhos que relacionam osso compacto, hipoatividade, treinamento físico em esteira e densidade óssea avaliada pela densitometria radiográfica.

A densidade óssea também foi avaliada de forma direta, através de Princípio de Arquimedes, método simples de fácil execução e baixo custo. (MARTIN, 1990; NORMAN et al., 2000; TREBACZ, 2001) Os resultados mostraram que a suspensão pela cauda, grupo S, provocou reduções significativas de densidade óssea, deixando os ossos mais frágeis, quando comparados com o grupo CI. O grupo SE e SL apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo S, evidenciando que a atividade física e movimentação livre foram suficientes para aumentar os valores de densidade óssea diminuída com a suspensão. Os valores expressos pelo grupo SE e grupo SL tiveram diferenças significativas entre eles devido ao treinamento físico ter sido mais eficiente do que a movimentação livre.

Nos estudos de Trebacz (2001), a movimentação livre por quatro semanas não foi suficiente para recuperar a densidade óssea em animais que permaneceram em imobilização por duas semanas. Usando esse mesmo método de investigação de densidade óssea - empuxo, Norman et al. (2000) relatam que não encontraram diferença entre os grupos estudados.

Ao se comparar os resultados encontrados pelas densitometria Radiográfica e pelo Princípio de Arquimedes observamos discrepâncias entre os resultados. A densidade óssea pela densitometria radiográfica nos grupos SE e SL foram estatisticamente iguais,

ao contrario da densidade óssea determinada pelo empuxo. As explicações que nos parecem mais plausíveis é que a análise feita pelo método do empuxo leva em consideração todo o osso, região compacta e esponjosa. Já a densitometria radiográfica foi realizada somente na região diafisária, com predominância de tecido compacto. De acordo com VÄÄNÄNEHK (1993), há uma diferença na velocidade de remodelação óssea entre osso esponjoso e compacto, esta diferença pode ter causado a diferença entre o grupo SE e SL detectados pelo empuxo.

Na análise histomorfométrica, mensuramos a espessura óssea compacta da diáfise femoral. Inicialmente, não houve o interesse da diferenciação anatômica das regiões que estavam sendo mensuradas, nosso objetivo era simplesmente determinar a espessura. Entretanto ao avaliar os resultados do grupo S, observamos um elevado desvio padrão. Este valor elevado pode ser compreendido pelas diferenças acentuadas das espessuras entre os lados analisados. Alguns animais apresentaram em um dos lados espessura pequena quando comparada com o outro lado. Nos estudos de Escribano et al. (1996) também foram mensuradas 2 regiões de interesses, estas não foram nomeadas, apenas citadas. Já nos estudos de Shaw et al. (1986), a espessura do osso compacto foi mensurada e identificada às regiões anterior, posterior, medial e lateral.

Nos estudos de Norman et al. (2000) o grupo controle e o grupo que permaneceu 21 dias em treinamento físico apresentaram maior espessura de região de metafisária proximal da tíbia, em relação aos animais do grupo que permaneceu suspenso por 21 dias e o grupo que após 21 dias de suspensão treinou em esteira por mais 21 dias. Seus estudos não demonstraram diferença entre o grupo suspenso e o grupo suspenso com treinamento físico em esteira.

Shaw et al. (1986) mostraram em seus estudos diferença significativa da espessura cortical anterior do grupo controle em relação ao grupo suspenso seguido de

movimentação livre, também relatou diferença entre o grupo controle o grupo suspenso seguido de treinamento físico, estes resultados foram em relação à região compacta do osso fêmur. No mesmo estudo, estes autores encontraram resultados diferentes em relação à tíbia, dos mesmos animais, ocorreu diferença da espessura cortical da região médio-lateral do grupo controle em relação ao grupo suspenso seguido de movimentação livre e do grupo suspenso seguido de treinamento físico em esteira.

### **Conclusão**

Os resultados demonstraram que a suspensão pela cauda causou diminuição da densidade óssea avaliada pela DR e Empuxo. A histomorfometria não acusou diferença nas espessuras dos grupos, entretanto traz indagações quanto ao efeito nas regiões avaliadas.

O treinamento físico em esteira foi mais eficiente que a movimentação livre apenas na variável de densidade óssea pelo Principio de Arquimedes. Nas variáveis densidade óssea radiográfica e histomorfometria não ocorreu diferença entre fazer atividade física em esteira e movimentar-se livremente.

**Referências**

APPEL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. a review. **Sports Med.**, v.10, n.1, p. 42-58, Jul. 1990.

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

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

ESCRIBIANO, A.; et al., Effect of lead on bone development and bone mass: A morphometric, densitometric, and histomorphometric study in growing rats. **Calcif. Tissue Inter**, v. 60, n.2, p. 2003-203, 1996.

FLUCKEY, J.D. et al.; A rat resistance exercise regimen attenuates losses of musculoskeletal mass during hindlimb suspension. **Acta Physiol Scand**, v.176, n.3, p.293-300, 2002.

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

GALANTE, J.; ROSTOKER, W.; RAY, R.D. Physical properties of trabecular bone. **Calcif. Tissue Res.**, v.5, n.3, p.236-246, 1970.

LARA, M.A.P., **Algumas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas submetidas a um modelo de hipoatividade e tratadas com exercício.** 2003. 71f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2003.

LOUZADA, M.J.Q. et al., Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. **Rev. Brás. Eng./Caderno de Eng. Biom.**, v.14, n.2, p.37-47, 1998.

KASPER, C.E.; WHITE, T.P.; MAXWELL, L.C. Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. **J. Appl. Physiol.**, v.68, n.2, p.533-539, Feb. 1990.

MARTIN, R.B.; Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **J. Biomech.**, v.23, n.10, p.1021-11029, 1990.

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

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

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



NORMAN, T.L.; et al. Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviat. Space. Environ. Med.**, v. 71, n. 6, p. 593-598, Jun. 2000.

SILVA, A.V. **Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato**. 2002. 71f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2002.

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

SHAW, S.R.; et al. Mechanical, morphological and biochemical adaptations of bone and muscle to hindlimb suspension and exercise. **J. Biomechanics**, v.20, n. 3. p. 225-234, 1987.

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

SOUZA, P.H.C; COSTA, N.P.; VEECK, E.B. Influence of soft tissues on mandibular gray scale levels. **Braz. Oral Res.** v. 18, n. 1, p. 40-44, 2004.

STEHLE, P. Summary of research issues in the animal model. **Bone**, v.22, Suppl.5 p. 101S-102S, May. 1998.

TREBACZ, H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. **J. Biomech.**, v.34, n.12, p.1631-1636, 2001.

TUNG-FU et al. The effect of overuse activity on achilles tendon in animal model: a biomechanical study. **Ann. Biomed. Engineer.** v.32, n.3, p.336-341, 2004.

TUUKKANEN, J.; PENG, Z.; VÄÄNÄNEN, H.K. Effect of running exercise of the bone loss induced by orchidectomy in the rats. **Cal. Tiss Int**, v. 55, n.1, p. 33-37, 1994.

VÄÄNÄNEN, H.K. Mechanism of bone turnover. **Ann Med.**, v. 25, n.3, p. 353-359, 1993.

Van der WIEL, H.E.; et al. L.Additional weight-bearing during exercise is more important than duration of exercise for anabolic stimulus of bone: a study of running exercise in female rats. **Bone**, v.16, n.1, p.73-80, 1995.

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

YEH, J.K.; et al.. Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: Determined by dual energy X-ray absorptiometry. **Cal. Tiss Int**, v.52, p. 234-238, 1992.

**REFERÊNCIAS**

- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p.855-877, 1990.
- ALBERTIN, L.M. Efeito do ultra-som sobre o reparo de falha óssea experimental; avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. **Rev. Brás. Fisioter.** v.8, n.1, p. 1-6, 2004.
- CARVALHO, C.M.M. **Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético**. Tese de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2001.
- CAVANAGH, et. al., Exercise and pharmacological countermeasures for bone loss during long-duration spaceflight. **Gravitational and Space Biology Bulletin**, v.18, n.2, p-39-58, 2005.
- CHIAVERINI, V **Tecnologia mecânica – Estrutura e propriedades: processos de fabricação**. v. I, Mc Graw-Hil do Brasil, São Paulo, 1979.
- COWIN, S.C. On Mechanosensation in bone under microgravity. **Bone**, v.22, Suppl.5, p.119S-125S, 1998.
- ESCRIBIANO, A.; et al., Effect of lead on bone development and bone mass: A morphometric, densitometric, and histomorphometric study in growing rats. **Calcif. Tissue Inter**, v. 60, n.2, p. 2003-203, 1996.
- FLUCKEY, J.D. et al.; A rat resistance exercise regimen attenuates losses of musculoskeletal mass during hindlimb suspension. **Acta Physiol Scand**, v.176, n.3, p.293-300, 2002.

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

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

JUNQUEIRA, J.C., CARNEIRO, J. **Fisiologia Básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogar, p.159-178, 1999.

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

LOUZADA, M.J.Q. et al.; Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. *Rev. Fac. Odontol. Lins*, v.13, n.1, p.33-38, 2001.

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

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

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

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

MUSACCHIA, XJ; et al., A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. **J. Appl. Physiol**, v.48, n.3, p.479-486, 1980.

NORMAN, T.L.; et al., Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviat. Space. Environ. Med.**, v. 71, n. 6, p. 593-598, 2000.

VÄÄNÄNEN, H.K. Mechanism of bone turnover. **Ann Med.**, v. 25, n.3, p. 353-359, 1993.

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

SCHAFFNER, G. Bone changes in weightlessness. 22 January 2001. Disponível em: [http://paperairplane.mit.edu/16.423J/Space/SBE/bone/bone\\_background.html](http://paperairplane.mit.edu/16.423J/Space/SBE/bone/bone_background.html). Acesso em 17 mar.2006.

SOUZA, S.A. Ensaios mecânicos de materiais metálicos. São Paulo: Ed Edgard Blücher, p.3-58, 1974.

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

SHAW, S.R.; et al. Mechanical, morphological and biochemical adaptations of bone and muscle to hindlimb suspension and exercise. **J. Biomechanics**, v.20, n. 3. p. 225-234, 1987.

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

SPENCE, A.P. **Anatomia Humana Básica**. 2.ed. São Paulo: Editora Manole, p. 95-149,1991.

TREBACZ, H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. **J. Biomech.**, v.34, n.12, p.1631-1636, 2001.

TUUKKANEN, J.; PENG, Z.; VÄÄNÄNEN, H.K. Effect of running exercise of the bone loss induced by orchidectomy in the rats. **Cal. Tiss Int**, v. 55, n.1, p. 33-37, 1994.

YEH, J.K.; et al.. Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: Determined by dual energy X-ray absorptiometry. **Calcified Tissue International**, v.52, p. 234-238, 1992.