

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO DO ULTRA-SOM DE BAIXA POTÊNCIA NA
REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS SOB AUSÊNCIA DE CARGA.
ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E BIOMECÂNICA**

Juliana de Carvalho Apolinário

Fisioterapeuta

ARAÇATUBA – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO DO ULTRA-SOM DE BAIXA POTÊNCIA NA
REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS SOB AUSÊNCIA DE CARGA.
ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E BIOMECÂNICA**

Juliana de Carvalho Apolinário

Orientador: Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Curso de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA DE CARVALHO APOLINÁRIO – nascida em 26 de novembro de 1981, na cidade de Andradina/SP. Graduação em Fisioterapia, 2003, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, UNIDERP, Campo Grande/MS. Especialização em Fisiologia do Exercício, 2005, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo/SP. Curso de aprimoramento em Reeducação Postural Global, 2005, Colégio Brasileiro de Estudos Sistêmicos, CBES, São Paulo/SP. Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – nível Mestrado da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba; Araçatuba/SP.

EPIGRAFE

Foi pela sabedoria que o Senhor criou a terra, foi com inteligência que ele formou os céus. Foi pela ciência que se fenderam os abismos, por ela as nuvens destilam o orvalho (Pro. 3, 18-20).

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho a Deus, por ter me abençoado e concedido forças para lutar e vencer. Aos meus pais, Antônio Vito e Rita de Cássia, por serem o alicerce de minha vida, Aos meus queridos irmãos, Gisele e Vitor Hugo, de onde tiro forças para lutar e dar bons exemplos. A minhas queridas avós, Emérita e Silvia, por me acalantar com palavras doces e me amar sinceramente. Aos meus avôs, Antonio e Luis (em memória). Aos meus “filhos” do grupo jovem por me apoiarem e compreenderem. Ao meu noivo, amigo e companheiro, Willian por tudo.

AGRADECIMENTOS

A UNESP por proporcionar a oportunidade de bem aprender.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal por dar oportunidade a profissionais de várias áreas, como os fisioterapeutas.

Aos meus familiares, em especial meus pais e irmãos, principais incentivadores na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada.

Ao Amigo e professor desta Instituição, Luís Eduardo.

Aos colegas do mestrado: Nandressa, Magnum e Bruna por todo subsídio na fase experimental, apoio e paciência.

Aos professores pelos ensinamentos, em especial aos professores que permitiram a realização desta pesquisa em seus Laboratórios.

A todos os funcionários da UNESP.

Aos companheiros de Laboratório e afins: Prof. Mário, Nandressa, Magnum, Bruna, Priscila, José Fonzar, Cristiane, Yuri, Carol, Pedrão, Prof. Sérgio, Prof. Antonio, Prof. Wagner, Prof. Luís Eduardo, Alexandre, Natália e Fernando.

A Tayná pela companhia e ajuda.

A todos os meus pacientes que compreenderam minha ausência, especial à paciente Zuleide por todo apoio.

Ao meu noivo, Willian, pela confiança, incentivo, compreensão, paciência, dedicação e subsídio em todo o decorrer desta fase de minha vida.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| CAPÍTULO 1..... | 10 |
| Considerações Gerais..... | 10 |
| Referências..... | 13 |
| CAPÍTULO 2..... | 16 |
| Artigo Científico..... | 16 |
| CAPÍTULO 3..... | 32 |
| Implicação..... | 32 |
| APÊNDICES..... | 33 |
| Apêndice A - Artigo encaminhado à publicação..... | 34 |
| Apêndice B - Normas para publicação..... | 51 |
| Apêndice C – Parecer do Comitê de Ética | 57 |

APLICAÇÃO DE ULTRA-SOM DE BAIXA POTÊNCIA NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS SOB AUSÊNCIA DE CARGA. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E BIOMECÂNICA.

RESUMO – A literatura apresenta que a resposta de reparo ósseo pode ser acentuada pela estimulação física, mecânica ou eletromagnética. Há evidências de que o ultra-som – US – de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea. Este trabalho objetivou verificar o efeito do US no defeito ósseo, criado experimentalmente, em tíbias de ratos sob ausência de carga (suspenso pela cauda) por meio de análise densitométrica e biomecânica. Trinta *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*, adultos, divididos em 3 grupos: G1 (n=10), não suspenso - experimento de 15 dias; G2 (n=10), suspenso pela cauda - experimento de 15 dias e, G3 (n=10), suspensos pela cauda, experimento de 36 dias. Os animais foram submetidos à osteotomia em ambas as tíbias e à aplicação do US (frequência de 1 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm²) na direita (12 sessões de 20 minutos). O G3 somente foi osteotomizado após 21º dia de suspensão. Para análises densitométrica utilizou-se densitômetro DPX-Lunar™, sistema digital Digora® e o programa computacional Image J®; para ensaio mecânico usou máquina universal de ensaio EMIC®. Os resultados do Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área (cm²), Densidade Mineral Óssea (g/cm²) e da Densidade Óssea (mmAl) observadas nas tíbias, assim como a Força Máxima (N) e Rigidez (x10³N/m) não demonstraram diferenças significantes (tratadas versus controle de cada grupo), possivelmente pelo menor tempo de tratamento com relação aos trabalhos encontrados na literatura. Concluindo que o Ultra-Som de baixa potência não acelerou o processo de consolidação óssea.

Palavras-Chave: Ausência de peso, Densidade óssea, Doenças ósseas metabólicas, Estimulação física, Osteotomia

APPLICATION OF LOW POWER ULTRASOUND IN BONE REPAIRING IN RATS UNDER LOAD ABSENCE. DENSITOMETRIC ANALYSIS AND BIOMECHANICAL.

SUMMARY – Literature shows that bone repair response can be accentuated by physical, mechanical or electromagnetic stimulation. There are evidences that low power ultrasound – US - can speed up bone regeneration. This work aimed at determining the effect of US in bone defects, experimentally created, in tibia from rats under load absence (suspended by the tail) by densitometric analysis and biomechanics. Thirty *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*, adult, divided in 3 groups: G1 (n=10), not suspended – a 15 day experiment; G2 (n=10), suspended by the tail – a 15 day experiment and, G3 (n=10), suspended by the tail – a 36 day experiment. , The animals have been submitted to the osteotomy in both tibias and to the US application (1 MHz frequency, cycle 1:4, 30mW/cm²), on the right (twelve sessions of 20 minutes). G3 was only osteotomized after the 21st day of suspension. DPX-Lunar™ densitometer, Digora® digital system and Image J® computer program were used for densitometrical analysis; for the mechanical assay, the universal machine of EMIC® assay was used. The results for Bone Mineral Content (g), Area (cm²), Bone Mineral Density (g/cm²) and Bone Density (mmAl) observed in tibias, as well as Maximum Power (N), and Rigidity (x10³N/m) did not show any significant differences (treated versus control of each group), possibly due to shorter treatment time as regards the studies found in literature. Concluding that the low power ultrasound not accelerated the process of consolidating bone.

Keywords: Weightlessness, Bone density, Bone metabolic diseases, Physical stimulation, Osteotomy

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Sendo um tecido conjuntivo dos mais resistentes e rígidos do nosso corpo, o tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, tem função de suporte para partes moles, proteção aos órgãos vitais, alojamento e proteção para medula óssea, armazenamento e fornecimento de minerais, proporciona apoio aos músculos esqueléticos para a movimentação do organismo e constitui um sistema de alavancas que pode aumentar as forças geradas na contração muscular. O osso é uma estrutura dinâmica, que se renova continuamente e é sensível a influências metabólicas, nutricionais, endócrinas e a fatores mecânicos, tais como tensão (GUYTON e HALL, 2002).

O osso é composto de aproximadamente 60% de mineral, 10% de água e em torno de 30% de matriz de colágeno. A força que um osso pode suportar não depende somente da quantidade absoluta de seus vários componentes, mas também da forma como estes componentes se correlacionam (ATHANASIOU et al., 2000 apud RODRIGUES et al., 2003). O tecido ósseo é formado principalmente por osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. As células formadoras de osso são os osteoblastos e os osteócitos, sendo a principal diferença entre elas a localização. Os osteoblastos se alinham na superfície óssea enquanto os osteócitos, que são osteoblastos maduros, estão inseridos na matriz mineralizada. Os osteoclastos reabsorvem osso (KAPLAN et al., 1994), cavando túneis na cortical óssea, e esta reabsorção faz parte do reparo ósseo normal (DOBLARÉ et al., 2004).

Durante toda a vida ocorre renovação do osso, tecido este que responde a estímulos variados (GUYTON e HALL, 2002). O osso se difere de outros materiais estruturais, pois é auto-reparador podendo alterar suas propriedades e geometria em resposta às mudanças na demanda mecânica (KAPLAN et al., 1994).

A deposição de osso é parcialmente regulada pela quantidade de tensão mecânica a ele imposta. A ausência de carga mecânica promove aumento no

processo de reabsorção óssea reduzindo assim a massa óssea (TURNER, 2000). Ossos quando submetidos a estresse mecânico se deformam apresentando osteoblastos mais ativos e se tornam mais fortes e resistentes por desencadearem reações fisiológicas que modificam seu tamanho e sua estrutura. O estresse mecânico no osso causa microfraturas, que são o estímulo à remodelação óssea. Já os ossos não submetidos à tensão, como os de um paciente impossibilitado de deambular, enfraquecem-se. Este desuso pode levar à ocorrência da osteoporose, pela falta de sustentação de peso e de atividade física, que provoca diminuição no estímulo mecânico necessário para crescimento e remodelamento ósseo (GUYTON e HALL, 2002).

O tecido ósseo é freqüentemente lesado, podendo ocorrer fraturas, situação onde há perda da continuidade óssea que podem ser completas ou incompletas. A proliferação celular e deposição de sais de cálcio determinam a regeneração do tecido ósseo e restabelece sua arquitetura e funcionalidade. O processo biológico de reparo ósseo pode ocorrer lentamente (retardo de consolidação) ou não se desenvolver (pseudoartrose), resultando em deficiência ou incapacidade para o indivíduo (DOBLARÉ et al., 2004).

O reparo tecidual é um dos fenômenos mais interessantes observado nos organismos vivos, podendo ser considerado como um dos mecanismos primários de sobrevivência. A remodelação óssea é um processo constante de reabsorção e formação óssea, necessária para manter o equilíbrio mineral ósseo, caracterizando assim o osso como anteriormente descrito, tecido permanentemente ativo. Esta remodelação ocorre também na tentativa de reparar fraturas, através da conexão das funções dos osteoblastos e dos osteoclastos e pode ser influenciada por forças mecânicas aplicadas ao esqueleto (SZEJNFELD, 2000).

A remodelação óssea e sua estimulação são motivos de inúmeros estudos, com intuito de acelerar a reabilitação dos pacientes. Estudos confirmam que a resposta do reparo ósseo pode ser acelerada pela estimulação física, tanto mecânica quanto eletromagnética (LIND e BÜNGER,

2001). Nesta linha há evidências de que o ultra-som de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea (DUARTE, 1977; XAVIER e DUARTE, 1983).

De acordo com Xavier e Duarte (1983) na utilização terapêutica do ultra-som na consolidação de fraturas, as cargas elétricas necessárias ao reparo ósseo são produzidas no osso por meio do efeito piezoeletrico.

O mecanismo de piezeletricidade é um advento físico segundo o qual alguns materiais quando deformados por uma ação mecânica, desenvolvem cargas elétricas superficiais no material. O contrário também é verdadeiro, ou seja, ao se colocar um material sob um campo elétrico, as cargas elétricas se integram e exibem deformações mecânicas. A piezeletricidade no tecido ósseo foi descrita pela primeira vez em 1957 por Fukada e Yasuda. O conhecimento desta propriedade e dos efeitos de propagação de ondas mecânicas nos materiais levou Duarte em 1977, a postular o princípio da estimulação ultrassônica de baixa potência do calo ósseo. E em 1983, Xavier e Duarte atribuíram a aceleração do processo de consolidação de fraturas ósseas, pelo ultra-som de baixa potência, ao mecanismo de piezeletricidade.

Um dos fatores responsáveis pela manutenção do metabolismo mineral normal dos ossos é a compressão longitudinal exercida sobre eles, produzida pelo efeito da gravidade sobre o arcabouço. A pressão estimula o crescimento ósseo por aposição. A descarga de peso resulta em maior espessura do osso e maior densidade da diáfise (MCARDLE et al., 2003). Contudo a exposição a ambientes de microgravidade afeta diretamente o sistema músculo-esquelético, alterando seu metabolismo. Esse ambiente gera uma baixa tensão sobre os ossos e, por conseqüência, menor massa óssea será necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto (JOHNSON, 1998).

Kasper et al. (1993) afirmaram que o modelo ideal para simular atrofia muscular e desgaste ósseo seria aquele que permitisse livre mobilidade ao animal, porém com restrição aos movimentos dos membros posteriores. De acordo com Vico et al. (1998), as características físicas do tecido podem variar consideravelmente por depender diretamente da carga que este tecido está submetido. O modelo usado por Vicentini et al. (2007) foi o de suspensão pela

cauda do animal, nessa situação os membros posteriores dos animais permanecem com livre movimentação, porém sem contato com o solo.

Na tentativa de entender o processo de consolidação óssea de animais acometidos por traumas em membros pélvicos, patologias neurológicas ou ortopédicas, e que permanecem imobilizados sofrendo alterações na estrutura óssea, empregasse o modelo de suspensão pela cauda (RISO, 2008).

Sabendo que diversas enfermidades acometem os animais (como luxação coxofemoral) provocando perda de marcha e prejudicando a manutenção do metabolismo mineral ósseo e conseqüentemente, a qualidade dos ossos (SOUZA e TUDURY, 2003); e considerando que a incidência de fraturas deverá quadruplicar nos próximos 50 anos em decorrência do aumento da expectativa de vida (RIGGS e MELTON, 1995), e que em seres humanos a partir dos 50 anos de idade, 30% das mulheres e 13% dos homens poderão sofrer algum tipo de fratura (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000), é objetivo deste estudo avaliar os efeitos do ultra-som na formação do calo ósseo, por meio de análises densitométricas e biomecânica em tíbias de ratos submetidos a ausência de carga, tendo como a hipótese que o ultra-som de baixa potência acelera o reparo ósseo.

REFERÊNCIAS

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v.17, n.13/14, p.1809-1840, 2004.

DUARTE, L.R. **Estimulação ultra-sônica do calo ósseo**. 1977. 109 f. Tese (Livre-Docência). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1977.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On piezoelectric effect of bone. **Journal of Physical Society of Japan**, v.12, n.10, p.1152-1162, 1957.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 973 p.

JOHNSON, R.B. The bearable lightness of being: bones, muscles, and spaceflight. **The Anatomical record**, v.253, n.1, p.24-27, 1998.

KAPLAN, F.S.; HAYES, W.C.; KEAVENY, T.M. Form and function of bone. In: Simon, S.R. (Ed.) **Orthopaedic basic science**. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994. p. 127-184.

KASPER, C.E.; McNULTY, A.L.; OTTO, A.J; THOMAS, D.P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: an empirical model. **Research in Nursing and Health**, v.16, n. 4, p.265-273, 1993.

LIND, M.; BÜNGER, C. Factors stimulating bone formation. **European Spine Journal**, v.10, suppl. 2, p. S102-S109, 2001.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. 1113 p.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **NIH Consensus Statement**, v.17, n.1, p.1-36, 2000.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. The worldwide problem of osteoporosis: insight afforded by epidemiology. **Bone**, v.17, suppl. 5, p.S505-S511, 1995.

RISO, N.D.M. **Influência do laser terapêutico no reparo de defeito ósseo de ratos submetidos à ausência de carga**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

RODRIGUES, M.E.S. **Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão.** 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Carlos, 2003.

SOUZA, A.F.A.; TUDURY, E.A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.8, n.47, p.54-66, 2003.

SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose: diagnóstico e tratamento.** São Paulo: Sarvier, 2000. 406p.

TURNER, R.T. Invited review: what do we know about the effects of spaceflight on bone? **Journal of Applied Physiology**, v.89, n. 2, p.840-847, 2000.

VICENTINI, C.R.; ROSA, R.A.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; SANTOS, P.H.; LOUZADA, M.J.Q. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos a ausência de carga e atividade física em esteira. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.1, p.62-71, 2007.

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

XAVIER, C.M.; DUARTE, L.R. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo: aplicação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.18, n.3, p.73-80, 1983.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DE ULTRA-SOM DE BAIXA POTÊNCIA NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS SOB AUSÊNCIA DE CARGA. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E BIOMECÂNICA.

Título

Efeito do Ultra-Som de Baixa Potência na Reparação Óssea em Ratos sob ausência de carga. Análise densitométrica e biomecânica.

Resumo

RESUMO - A resposta de reparo ósseo pode ser acentuada pela estimulação física, tanto mecânica quanto eletromagnética. Há evidências de que o ultra-som de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea. Este trabalho objetivou verificar o efeito do ultra-som de baixa potência no defeito ósseo, criado experimentalmente, em tíbias de ratos sob ausência de carga, utilizando análise densitométrica e biomecânica. Trinta *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* adultos, divididos em: G1 (n=10), sem suspensão - 15 dias; G2 (n=10), suspenso pela cauda - 15 dias e G3 (n=10), suspensos pela cauda - 36 dias, foram submetidos à osteotomia em ambas as tíbias e à aplicação do ultra-som pulsado de baixa potência em tíbia direita (frequência de 1 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm²), por 12 sessões de 20 minutos. Para análises utilizou-se densitômetro DPX-Lunar™, sistema digital Digora®, Image J® e ensaio mecânico com máquina universal de ensaio EMIC®. Os resultados não demonstraram diferenças significantes nas variáveis estudadas, ao comparar os lados tratados com os controles de cada grupo, possivelmente pelo menor tempo de tratamento com relação aos trabalhos encontrados na literatura. Concluindo que o Ultra-Som de baixa potência não acelerou o processo de consolidação óssea.

Palavras Chaves

Palavras Chaves: Ausência de peso, Densidade óssea, Doenças ósseas metabólicas, Estimulação física, Osteotomia

Introdução

Um complexo mecanismo de remodelação em nível celular, que incide de forma alternada entre formação e reabsorção óssea, conduz o tecido ósseo. Um ambiente desprovido de estímulos mecânicos produz efeitos diretos na estrutura óssea e altera sua função (HOLICK, 1998; SHIMANO, 2006). Assim a conservação do metabolismo mineral ósseo normal depende de solicitações mecânicas geradas pelas contrações musculares e pela força da gravidade (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000).

A proliferação celular e deposição de sais de cálcio determinam a regeneração do tecido ósseo lesado e restabelece sua arquitetura e funcionalidade (DOBLARÉ et al., 2004). Quando a regeneração óssea não ocorre da forma esperada, torna-se necessário o implemento de métodos coadjuvantes, como o ultra-som (US) de baixa potência, para a obtenção dos resultados esperados. A base fisiológica para a utilização do US como método terapêutico, para o estímulo da osteogênese, está nas propriedades biomecânicas do osso, pois tanto o impacto físico promovido pela descarga corporal quanto o promovido pelas ondas mecânicas do US provocam deformações nos ossos (NARUSE et al., 2000).

Sabendo-se que diversas enfermidades acometem os animais provocando perda da marcha e prejudicando a manutenção do metabolismo mineral ósseo e conseqüentemente a qualidade dos ossos (SOUZA e TUDURY, 2003); já em seres humanos a partir dos 50 anos de idade, 30% das mulheres e 13% dos homens poderão sofrer algum tipo de fratura (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000), e que a incidência de fraturas deverá

quadruplicar nos próximos 50 anos em decorrência do aumento da expectativa de vida (RIGGS e MELTON, 1995), é objetivo deste estudo avaliar os efeitos do US na formação do óssea, por meio de análises densitométrica e biomecânica em tíbias de ratos submetidos a ausência de carga, tendo como a hipótese que o US de baixa potência acelera a formação óssea.

Material e Métodos

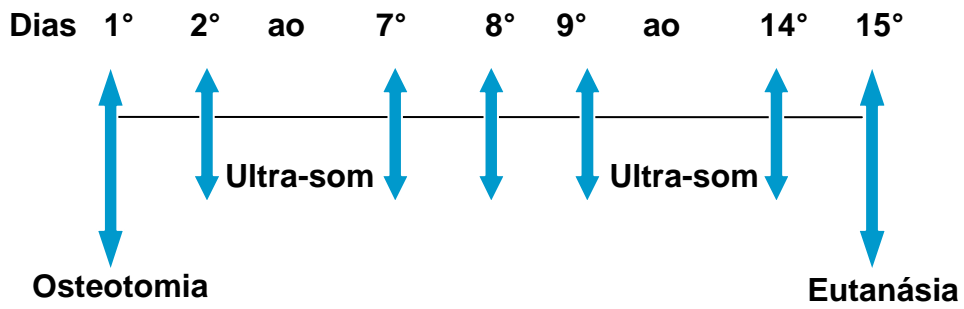
Grupos Experimentais

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba (Protocolo nº 2007-002868), foram utilizados trinta ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, adultos com massa corporal média de 348 ± 14 g fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba – SP e mantidos com ração comercial e água à vontade e sob temperatura controlada de 23°C.

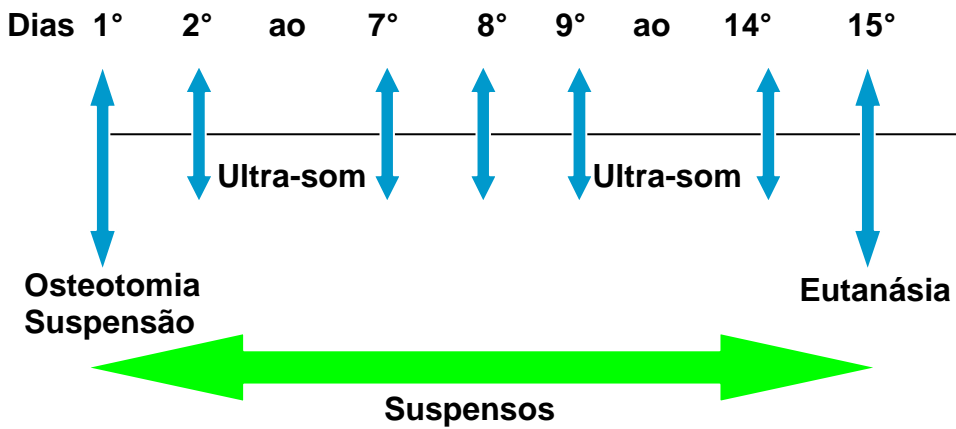
Os animais foram divididos em três grupos iguais: G1 - animais submetidos à cirurgia para osteotomia que permaneceram livres em gaiolas individuais por 15 dias e foram tratados com US; G2 - animais submetidos à cirurgia para osteotomia e suspensos pela cauda por 15 dias e, concomitantemente, tratados com US; G3 - animais suspensos pela cauda e, após 21 dias de suspensão, foram submetidos à cirurgia para osteotomia e novamente suspensos por 15 dias e tratados com US (Esquema 1). Os membros contra laterais foram os controles.

Esquema 1:

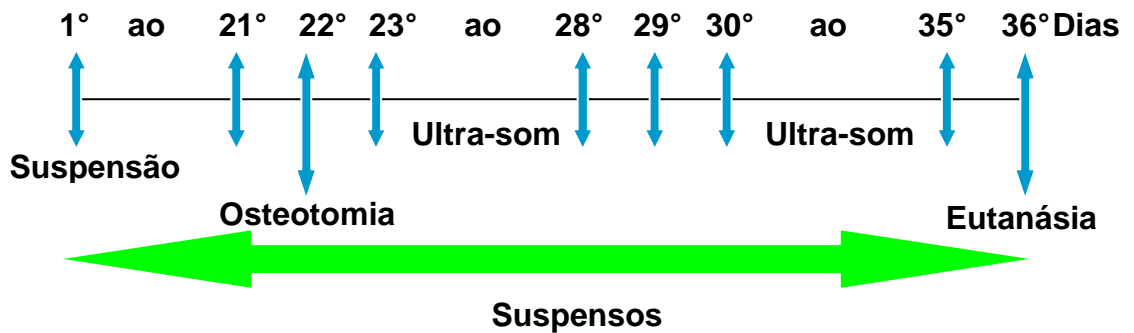
Grupo 1



Grupo 2



Grupo 3



Cirurgia

Foram realizadas osteotomias cirúrgicas em ambas as tíbias, em região diafisária média (Figura 1), estando os animais sob anestesia geral com Ketamina (30mg/kg) e Xilazina (3mg/kg), via intramuscular.

Para realização da osteotomia, a superfície anterior dos membros pélvicos dos animais, na região do terço médio, foi submetida à tricotomia. A seguir foi realizada incisão da pele no sentido longitudinal da tíbia e os músculos foram afastados com espátula, permitindo acesso ao osso. O defeito ósseo então foi obtido por perfuração com broca cirúrgica de 2 mm, acoplada a motor de baixa rotação (uso odontológico), passando pelo perióstio, cortical óssea, até atingir o endóstio. Em todo o processo, soro fisiológico foi gotejado para a não necrose por aquecimento. Após a perfuração, o tecido muscular foi reposicionado e suturado e a pele também suturada (MELO, 2003; RISO, 2008).



Figura 1. Osteotomia em região diafisária média da tíbia.

Após a cirurgia, por três dias os animais receberam Buprenorfina (0,02 ml de 12 em 12 h) via subcutânea, para analgesia pós-operatória e receberam Pentabiótico (0,035ml) imediatamente após cirurgia como profilaxia antimicrobiana.

Técnica de Suspensão

A técnica de suspensão foi a mesma utilizada por Vicentini et al. (2007), divergindo no preparo da cauda do animal, que no presente estudo foi lavada com sabonete líquido anti-séptico e substituída a tintura de Benjoin por Iodopovidine tópico. A técnica de suspensão que, segundo Morey-Holton e Globus (1998), provoca um mínimo de estresse ao animal, foi realizada após a osteotomia, com os animais ainda anestesiados, nos grupos 1 e 2 e, realizada no grupo 3 no primeiro dia experimental com os animais anestesiados com Ketamina (30mg/kg) e Xilazina (3mg/kg), via intramuscular.



Figura 2. Animal suspenso pela cauda.

Tratamento com Ultra-som

Os animais foram imobilizados manualmente durante a terapia e apenas o membro direito de todos os grupos foi tratado com US pulsado de baixa potência, frequência de 1 MHz, ciclo de trabalho 1:4, $30\text{mW}/\text{cm}^2$, por 12 sessões de 20 minutos cada, servindo o membro esquerdo como controle. O protocolo de tratamento se iniciou no primeiro dia após a osteotomia. As aplicações foram executadas de forma padronizada, ocorrendo a primeira, 24

horas após a osteotomia, com intervalo de 48 horas após 6 sessões consecutivas, cumprindo-se um total de 12 sessões de tratamento.



Figura 3. Aparelho de Ultra-som (cedido pela Escola de Engenharia São Carlos – USP)

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina e então eutanasiados com Pentobarbital 1,5 ml (Tiopental[®]) intravenoso e suas tíbias foram retiradas para análise densitométrica e biomecânica.

Densitometria Óssea

Após a eutanásia, as tíbias foram desarticuladas, removidas, dissecadas e submetidas à análise densitométrica em densitômetro de dupla emissão de raios - X (DXA) (modelo DPX-Alpha, Lunar[®]) com software especial para pequenos animais (Marques, 2008).



Figura 4. Densitômetro de dupla emissão de raios - X (DEXA).



Figura 5. Programa Computacional do DEXA.

Depois, as tíbias foram radiografadas por meio do aparelho de raios X GE-100 (General Electric[®], Milwaukee, EUA), operando com 60 Kvp, 8mA, 12 pulsos, com distância foco-filme de 20 cm e com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto. As imagens digitais das tíbias e de sua identificação junto a uma escada de alumínio de 9 degraus, cada degrau com 5x25mm² de área usada como referencial densitométrico, foram obtidas utilizando a placa óptica do sistema digital Digora[®] (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As placas ópticas foram então colocadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora[®], lidas e armazenadas no programa computacional do sistema e as densidades radiográficas foram

medidas na região da osteotomia, numa área de 30x10 pixels, e nos degraus da escada de alumínio, numa área de 24x84 pixels. Com os valores de espessura dos degraus da escada e os valores de densidade radiográfica (expressos em níveis de cinza - 256 tons) foi determinada uma equação, para cada radiografia, que serviu para calcular os valores de densidade óssea em milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA et al., 1998; SALZEDAS et al., 2006).



Figura 6. Equipamento Digora®.

Como o sistema digital Digora® avalia somente área regular do defeito ósseo (retângulo), as imagens digitalizadas pelo sistema Digora® também foram exportadas em formato TIFF (“Tagged Image File Format”) e analisadas pelo programa computacional Image J® (livre na internet).

O Image J® foi utilizado para avaliar a área irregular da tíbia que continha o defeito ósseo, calculando seu nível de densidade, em tons de cinza, e dos degraus da escada de alumínio. Novamente, os valores de densidade das tíbias foram convertidos para valores relativos à espessura em milímetros de alumínio (mmAl).

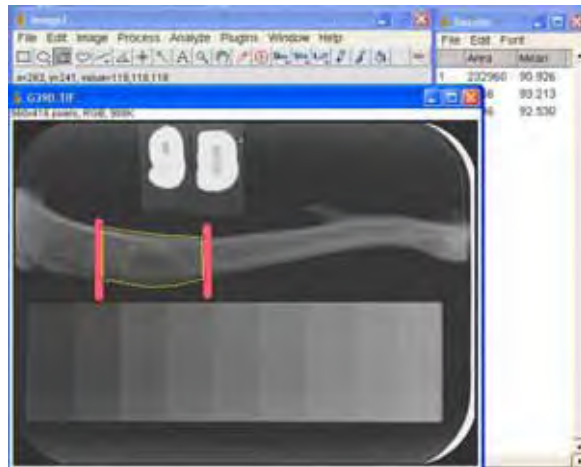


Figura 7. Programa Computacional Image J[®]

Ensaio Mecânico

Nos ensaios mecânicos foi utilizada máquina universal de ensaio EMIC[®], modelo DL 3000, pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da FOA /Unesp-Araçatuba, com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min.

Na análise biomecânica foi determinada a força máxima admitida pela tibia e sua rigidez, 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 8. Máquina universal de ensaio mecânico EMIC[®], modelo DL 3000.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Teste T de Student, pareado para comparar as tíbias tratadas e controle para cada grupo, com o programa computacional GraphPad InStat[®], versão 3.06.

Os resultados foram todos apresentados como média \pm desvio padrão. O nível de significância utilizado foi de 5% em todas as análises.

Resultado

Densitometria Óssea

Os resultados da análise densitométrica, tanto pelo densitômetro de dupla emissão de raios - X (DXA) (Tabela 1) quanto pelo sistema digital Digora[®] (Tabela 2) e pelo software Image J[®] (Tabela 3), não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) entre as tíbias tratadas e controle de cada grupo, indicando assim que o US não interveio na quantidade mineral óssea.

Tabela 1 - Média e desvio padrão do Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) em gramas, Área em cm² e Densidade Mineral Óssea em g/cm² (DMO) observadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos Grupos 1, 2 e 3

| GRUPO | CMO ¹ | | ÁREA ¹ | | DMO ¹ | |
|-------|------------------|-------------|-------------------|-------------|------------------|-------------|
| | TRATADA | CONTROLE | TRATADA | CONTROLE | TRATADA | CONTROLE |
| G1 | 0,266 \pm | 0,283 \pm | 1,677 \pm | 1,766 \pm | 0,159 \pm | 0,160 \pm |
| | 0,035 | 0,025 | 0,098 | 0,069 | 0,018 | 0,014 |
| G2 | 0,197 \pm | 0,183 \pm | 1,408 \pm | 1,271 \pm | 0,141 \pm | 0,145 \pm |
| | 0,016 | 0,025 | 0,118 | 0,137 | 0,010 | 0,020 |
| G3 | 0,197 \pm | 0,217 \pm | 1,369 \pm | 1,453 \pm | 0,147 \pm | 0,150 \pm |
| | 0,034 | 0,034 | 0,118 | 0,082 | 0,029 | 0,025 |

¹ $p > 0,05$

Tabela 2 - Média e desvio padrão da Densidade Óssea (mmAl) observadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3; Análise realizada pelo sistema digital Digora[®]

| GRUPO | DENSIDADE ÓSSEA (mmAl) ¹ | |
|-------|-------------------------------------|-----------------|
| | TRATADA | CONTROLE |
| G1 | 1,17 \pm 0,17 | 1,19 \pm 0,10 |
| G2 | 1,43 \pm 0,18 | 1,46 \pm 0,28 |
| G3 | 1,12 \pm 0,27 | 1,24 \pm 0,23 |

¹ $p > 0,05$

Tabela 3 - Média e desvio padrão da Densidade Óssea (mmAl), mensurada na área irregular da tíbia incluindo o defeito ósseo pelo software Image J®, calculadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3

| GRUPO | DENSIDADE ÓSSEA (mmAl) ¹ | |
|-------|-------------------------------------|-------------|
| | TRATADA | CONTROLE |
| G1 | 1,65 ± 0,23 | 1,53 ± 0,26 |
| G2 | 1,59 ± 0,30 | 1,61 ± 0,33 |
| G3 | 1,41 ± 0,13 | 1,39 ± 0,11 |

¹ p > 0,05

Ensaio Mecânico

Os resultados do teste de flexão não apresentaram diferenças significantes (p > 0,05) (Tabela 4) quando relacionadas às variáveis mecânicas: força máxima e rigidez das tíbias tratadas e controle sugerindo que o tratamento não interferiu nas propriedades mecânicas do terço médio da tíbia.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da Força Máxima (N) e Rigidez (x10³N/m) observadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3

| GRUPO | FORÇA MÁXIMA (N) | | RIGIDEZ (x10 ³ N/m) | |
|-------|------------------|--------------|--------------------------------|----------|
| | TRATADA | CONTROLE | TRATADA | CONTROLE |
| G1 | 68,66 ± | 68,08 ± | 151,41 ± | 130,41 ± |
| | 22,17 | 14,92 | 59,46 | 51,82 |
| G2 | 49,51 ± 8,02 | 52,11 ± 7,99 | 130,82 ± | 136,57 ± |
| | | | 39,53 | 18,03 |
| G3 | 72,19 ± | 67,72 ± | 161,11 ± | 147,20 ± |
| | 13,03 | 16,75 | 37,54 | 32,59 |

p > 0,05

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo concordam com Carvalho e Cliquet Junior (2003) que analisando a ação do US pulsado de baixa potência durante 20 dias consecutivos, por 20 minutos diários, na região proximal dos fêmures de ratas osteopênicas, evidenciaram uma melhora da arquitetura dos ossos (análise qualitativa), mas não do conteúdo mineral (análise quantitativa), supondo 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. Os autores comentam que a duração do tratamento com US de baixa potência talvez não tenha sido suficiente para possibilitar a total mineralização das regiões estimuladas, o que não possibilitou alterações de forma quantitativa, fato este que pode ter influenciado os resultados do presente trabalho, uma vez que usamos somente análises quantitativas.

Em trabalho realizado por Lirani (2004), foi evidenciada uma fase mais adiantada do reparo ósseo do grupo tratado com US em comparação ao grupo controle, no entanto, nos resultados quantitativos (ensaio mecânico) não foi observada maior carga máxima suportada pelos ossos tratados, o que concorda com os achados aqui apresentados. Isto talvez seja justificado pelo menor tempo de tratamento utilizado no presente trabalho e no de Lirani (2004), quando comparados com outros com maior tempo de aplicação do US (AZUMA et al., 2001; TAKIKAWA et al., 2001; WARDEN et al., 2006).

O estudo realizado por Warden et al. (2006) investigou o efeito do US sobre o reparo ósseo de fratura em fêmur de ratos tratados com US durante 16 e 27 dias; por 20 minutos. O grupo experimental de 25 dias não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os fêmures tratados e controle, nas análises densitométricas e biomecânicas, diferentemente do grupo experimental de 40 dias, que teve um aumento de 14,3% no conteúdo mineral ósseo e 25,8% na área óssea (Análise densitométrica – DXA) ao comparar os fêmures tratados com os controles e um acréscimo também na força máxima (81,3%) e na rigidez (63,4%) (Análise Biomecânica – Ensaio Mecânico) nos fêmures tratados em relação aos controles. Estes achados reforçam a hipótese, de que no presente trabalho não foi encontrada influência do US de baixa potência, devido ao pequeno número de sessões de tratamento.

Neste trabalho, no momento da dissecação das tíbias observou-se uma diminuição da coloração na musculatura que envolvia a tíbia tratada, comparado com a da tíbia controle, sugestiva de necrose. Este dado sugere a necessidade da realização de um estudo direcionado à obtenção do efeito secundário do US pulsado de baixa potência, na musculatura adjacente à região óssea tratada.

Conclusão

O US de baixa potência nas condições experimentais deste trabalho não acelerou o processo de reparo ósseo.

Referências

AZUMA, Y.; ITO, M.; HARADA, Y.; TAKAGI, H.; OHTA, T.; JINGUSHI, S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. **J. Bone Miner. Res.**, v.16, n.4, p.671-680, 2001.

CARVALHO, D.C.L.; CLIQUET JUNIOR, A. Low intensity ultrasound effects over osteopenic female rats bones. **Acta Ortop. Bras.**, v.11, n.1, p.17-24, 2003.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng. Fract. Mech.**, v.17, n. 13/14, p.1809-1840, 2004.

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

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato**. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. **Ver. Brás. Eng., Cad. Eng. Bioméd.**, v.14, n.2, p.37-47, 1998.

MARQUES, T.M. **Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio.** 2008. 45f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

MELO, L.G.N. **Avaliação do processo de reparo ósseo em cavidades cirúrgicas preenchidas com partículas de vidro bioativo associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio: estudo histomorfométrico em tíbias de rato.** 2003. 157f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

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.

NARUSE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; AZUMA, Y.; ITO, M.; OOTA, T.; KAMEYAMA, K.; ITOMAN, M. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.268, n. 1, p.216-220, 2000.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. **NIH Consensus Statement.** v.17, n.1, p.1-36, 2000.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. The worldwide problem of osteoporosis: insight afforded by epidemiology. **Bone**, v.17, suppl.5, p. 505S-511S, 1995.

RISO, N.D.M. **Influência do laser terapêutico no reparo de defeito ósseo de ratos submetidos à ausência de carga.** 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado).

Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

SALZEDAS, L.M.P.; LOUZADA, M.J.Q.; OLIVEIRA FILHO, A.B. Radiopacity of restorative materials using digital images. **J. Appl. Oral Sci.**, v.14, n.2, p.147-152, 2006.

SHIMANO, M.M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercício.** 2006. 89f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOUZA, A.F.A.; TUDURY, E.A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico – revisão. **Ver. Clín. Vet.**, v.8, n.47, p.54-66, 2003.

TAKIKAWA, S.; MATSUI, N.; KOKUBU, T.; TSUNODA, M.; FUJIOKA, H.; MIZUNO, K.; AZUMA, Y. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **J. Ultrasound Méd.**, v.20, n. 3, p.197-205, 2001.

VICENTINI, C.R.; ROSA, R.A.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; SANTOS, P.H.; LOUZADA, M.J.Q. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos a ausência de carga e atividade física em esteira. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.1, p.62-71, 2007.

WARDEN, S.J.; FUCHS, R.K.; KESSLER, C.K.; AVIN, K.G.; CARDINAL, R.E.; STEWART, R.L. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. **Phys. Ther.**, v.86, n.8, p.1118-1127, 2006.

CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÃO

No momento da dissecação das tíbias observou-se uma diminuição da coloração na musculatura que envolvia a tíbia tratada, comparado com a da tíbia controle, sugestiva de necrose. Este dado sugere a necessidade da realização de um estudo direcionado à obtenção do efeito secundário do ultrassom pulsado de baixa potência, frequência de 1 MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm^2 , na musculatura adjacente à região óssea tratada.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ARTIGO ENCAMINHADO À PUBLICAÇÃO

Efeito do Ultra-Som de Baixa Potência na Reparação Óssea em Ratos sob ausência de carga. Análise densitométrica e biomecânica.

Effect of Low Power Ultrasound in Bone Repairing in Rats Under Load Absence. Densitometric Analysis and Biomechanical.

Efecto de la Ultrasonido de Baja Potencia en la Reparación Ósea del Ratones donde no hay carga. Análisis densitométrica y biomecánica.

Juliana de Carvalho Apolinário¹, Mário Jefferson Quirino Louzada²

Mário Jefferson Quirino Louzada - Rua: Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, CEP 16050-680, Araçatuba/SP. Telefone (18) 3636-3200 R. 3627 – Fax (18) 3622-6487 e-mail: louzada@fmva.unesp.br

* Pesquisa financiada pela FAPESP processo nº 07/54443-0

1. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – UNESP/Araçatuba, SP. juliana.apolinario@yahoo.com.br

2. Professor Ass. Dr. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP/Araçatuba, SP. louzada@fmva.unesp.br

Efeito do Ultra-Som de Baixa Potência na Reparação Óssea em Ratos sob Ausência de Carga. Análise Densitométrica e Biomecânica.

RESUMO - A resposta de reparo ósseo pode ser acentuada pela estimulação física, tanto mecânica quanto eletromagnética. Há evidências de que o ultra-som de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea. Este trabalho objetivou verificar o efeito do ultra-som de baixa potência no defeito ósseo, criado experimentalmente, em tíbias de ratos sob ausência de carga, utilizando análise densitométrica e biomecânica. Trinta *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* adultos, divididos em: G1 (n=10), sem suspensão - 15 dias; G2 (n=10), suspenso pela cauda - 15 dias e G3 (n=10), suspensos pela cauda - 36 dias, foram submetidos à osteotomia em ambas as tíbias e à aplicação do ultra-som pulsado de baixa potência em tíbia direita (frequência de 1 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm²), por 12 sessões de 20 minutos. Para análises utilizou-se densitômetro DPX-Lunar™, sistema digital Digora®, Image J® e ensaio mecânico com máquina universal de ensaio EMIC®. Os resultados não demonstraram diferenças significantes nas variáveis estudadas, ao comparar os lados tratados com os controles de cada grupo, possivelmente pelo menor tempo de tratamento com relação aos trabalhos encontrados na literatura. Concluindo que o Ultra-Som de baixa potência não acelerou o processo de consolidação óssea.

Palavras-chave: Ausência de peso, Densidade óssea, Doenças ósseas metabólicas, Estimulação física, Osteotomia

Effect of Low Power Ultrasound in Bone Repairing in Rats Under Load Absence. Densitometric Analysis and Biomechanical.

ABSTRACT - Bone repair response can be accented by physical stimulation, either mechanic or electromagnetic. There are evidences that low power ultrasound can speed up bone regeneration. This work had the objective of determine the effect of low power ultrasound in bone defects, experimentally created, in tibia from rats under load absence, by densitometric analysis and biomechanics. Thirty *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* adult, divided in: G1 (n=10), without suspension - 15 days; G2 (n=10), suspended by the tail - 15 days and G3 (n=10), suspended by the tail - 36 days, have been submitted to the osteotomia in both tibias and to the application of pulsed low

power ultrasound (1 MHz frequency, cycle 1:4, 30mW/cm²), for 12 sessions of 20 minutes each. DPX-LunarTM densitometer, Digora[®] digital system, Image J[®] and mechanical assay with universal machine of EMIC[®] assay were used to analyze the bone. There were no significant differences in the variables analyzed, when comparing the treated sides with the respective controls in each group, possible due to the our shorter time of treatment when compared with other studies. Concluding that the low power ultrasound not accelerated the process of consolidating bone.

Key words: weight absence, bone density, bone metabolic disorders, physical stimulation, osteotomia

Efecto de la Ultrasonido de Baja Potencia en la Reparación Osea del Ratones donde no hay carga. análisis densitométrica y biomecánica.

RESUMEN - Se puede accentuar la respuesta del reparo óseo por la estimulación física, tanto mecánica como electromagnética. Hay evidencias de que el ultrasonido de baja potencia puede acelerar la regeneración ósea. Este trabajo objetivó a la verificación del efecto del ultrasonido de baja potencia en el defecto óseo, experimentalmente creado, en tibias de ratones bajo ausencia de carga utilizando análisis densitométrica y biomecánica.. Treinta *Rattus Novergicus Albinus*, *Wistar* adultos, divididos en: G1 (n=10), sin suspensión - 15 días; G2 (n=10), suspendidos por la cola - 15 días y G3 (n=10), suspendidos por la cola - 36 días, se sometieron a la osteotomía en ambas las tibias y a la aplicación del ultrasonido pulsado de baja potencia (frecuencia de 1 MHz, ciclo 1:4, 30mW/cm²), por 12 sesiones de 20 minutos. Para las análises se utilizó el densitómetro DPX-LunarTM, sistema digital Digora[®], Image J[®] y ensayo mecánico con máquina universal de ensayo EMIC[®]. Los resultados no demostraron diferencias significantes en las variables estudiadas, al compararse los lados tratados a los controles de cada grupo, posiblemente debido al más corto tiempo de tratamiento en relación a los trabajos encontrados en la literatura. Concluyendo que lo ultrasonido de baja potencia no se aceleró el proceso de consolidación ósea.

Palabras-clave: Ausencia de peso. Densidad Ósea, Enfermedades óseas metabólicas, Estimulación física, Osteotomía.

INTRODUÇÃO

Um complexo mecanismo de remodelação em nível celular, que incide de forma alternada entre formação e reabsorção óssea, conduz o tecido ósseo. Um ambiente desprovido de estímulos mecânicos produz efeitos diretos na estrutura óssea e altera sua função (HOLICK, 1998; SHIMANO, 2006). Assim a conservação do metabolismo mineral ósseo normal depende de solicitações mecânicas geradas pelas contrações musculares e pela força da gravidade (NIH, 2000).

A proliferação celular e deposição de sais de cálcio determinam a regeneração do tecido ósseo lesado e restabelece sua arquitetura e funcionalidade (DOBLARÉ et al., 2004). Quando a regeneração óssea não ocorre da forma esperada, torna-se necessário o implemento de métodos coadjuvantes, como o ultra-som (US) de baixa potência, para a obtenção dos resultados esperados. A base fisiológica para a utilização do US como método terapêutico, para o estímulo da osteogênese, está nas propriedades biomecânicas do osso, pois tanto o impacto físico promovido pela descarga corporal quanto o promovido pelas ondas mecânicas do US provocam deformações nos ossos (NARUSE et al., 2000).

Sabendo-se que diversas enfermidades acometem os animais provocando perda da marcha e prejudicando a manutenção do metabolismo mineral ósseo e conseqüentemente a qualidade dos ossos (ALBUQUERQUE SOUZA e TUDURY, 2003); já em seres humanos a partir dos 50 anos de idade, 30% das mulheres e 13% dos homens poderão sofrer algum tipo de fratura (NIH, 2000), e que a incidência de fraturas

deverá quadruplicar nos próximos 50 anos em decorrência do aumento da expectativa de vida (RIGSS e MELTON, 1995), é objetivo deste estudo avaliar os efeitos do US na formação óssea, por meio de análises densitométrica e biomecânica em tíbias de ratos submetidos a ausência de carga, tendo como a hipótese que o US de baixa potência acelera a formação óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos Experimentais

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba (Protocolo n° 2007-002868), foram utilizados trinta ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, adultos com massa corporal média de 348 ± 14 g fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba – SP e mantidos com ração comercial e água à vontade e sob temperatura controlada de 23°C.

Os animais foram divididos em três grupos iguais: G1 - animais submetidos à cirurgia para osteotomia que permaneceram livres em gaiolas individuais por 15 dias e foram tratados com US; G2 - animais submetidos à cirurgia para osteotomia e suspensos pela cauda por 15 dias e, concomitantemente, tratados com US; G3 - animais suspensos pela cauda e, após 21 dias de suspensão, foram submetidos à cirurgia para osteotomia e novamente suspensos por 15 dias e tratados com US. Os membros contra laterais foram os controles.

Cirurgia

Foram realizadas osteotomias cirúrgicas em ambas as tíbias, em região diafisária média, estando os animais sob anestesia geral com Ketamina (30mg/kg) e Xilazina (3mg/kg), via intramuscular.

Para realização da osteotomia, a superfície anterior dos membros pélvicos dos animais, na região do terço médio, foi submetida à tricotomia. A seguir foi realizada incisão da pele no sentido longitudinal da tíbia e os músculos foram afastados com espátula, permitindo acesso ao osso. O defeito ósseo então foi obtido por perfuração com broca cirúrgica de 2 mm, acoplada a motor de baixa rotação (uso odontológico), passando pelo periósteo, cortical óssea, até atingir o endósteo. Em todo o processo, soro fisiológico foi gotejado para a não necrose por aquecimento. Após a perfuração, o tecido muscular foi reposicionado e suturado e a pele também suturada (MELO, 2003; RISO, 2008).

Após a cirurgia, por três dias os animais receberam Buprenorfina (0,02 ml de 12 em 12 h) via subcutânea, para analgesia pós-operatória e receberam Pentabiótico (0,035ml) imediatamente após cirurgia como profilaxia antimicrobiana.

Técnica de Suspensão

A técnica de suspensão foi a mesma utilizada por Vicentini et al. (2007), divergindo no preparo da cauda do animal, que no presente estudo foi lavada com sabonete líquido anti-séptico e substituída a tintura de Benjoin por Iodopovedine tópico. A técnica de suspensão que, segundo Morey-Holton e Globus (1998), provoca um mínimo de estresse ao animal, foi realizada após a osteotomia, com os animais ainda anestesiados, nos grupos 1 e 2 e, realizada no grupo 3 no primeiro dia experimental com

os animais anestesiados com Ketamina (30mg/kg) e Xilazina (3mg/kg), via intramuscular.

Tratamento com US

Os animais foram imobilizados manualmente durante a terapia e apenas o membro direito de todos os grupos foi tratado com US pulsado de baixa potência, frequência de 1 MHz, ciclo de trabalho 1:4, 30mW/cm², por 12 sessões de 20 minutos cada, servindo o membro esquerdo como controle. O protocolo de tratamento se iniciou no primeiro dia após a osteotomia. As aplicações foram executadas de forma padronizada, ocorrendo a primeira, 24 horas após a osteotomia, com intervalo de 48 horas após 6 sessões consecutivas, cumprindo-se um total de 12 sessões de tratamento.

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina e então eutanasiados com Pentobarbital 1,5 ml (Tiopental[®]) intravenoso e suas tíbias foram retiradas para análise densitométrica e biomecânica.

Densitometria Óssea

Após a eutanásia, as tíbias foram desarticuladas, removidas, dissecadas e submetidas à análise densitométrica em densitômetro de dupla emissão de raios - X (DXA) (modelo DPX-Alpha, Lunar[®]) com software especial para pequenos animais (Marques, 2008). Depois, as tíbias foram radiografadas por meio do aparelho de raios X GE-100 (General Electric[®], Milwaukee, EUA), operando com 60 Kvp, 8mA, 12 pulsos, com distância foco-filme de 20 cm e com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto. As imagens digitais das tíbias e de sua identificação junto a uma escada de alumínio de 9 degraus, cada degrau com 5x25mm² de área usada como referencial densitométrico, foram obtidas utilizando a placa óptica do sistema digital

Digora[®] (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As placas ópticas foram então colocadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora[®], lidas e armazenadas no programa computacional do sistema e as densidades radiográficas foram medidas na região da osteotomia, numa área de 30x10 pixels, e nos degraus da escada de alumínio, numa área de 24x84 pixels. Com os valores de espessura dos degraus da escada e os valores de densidade radiográfica (expressos em níveis de cinza - 256 tons) foi determinada uma equação, para cada radiografia, que serviu para calcular os valores de densidade óssea em milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA et al., 1998; SALZEDAS et al., 2006).

Como o sistema digital Digora[®] avalia somente área regular do defeito ósseo (retângulo), as imagens digitalizadas pelo sistema Digora[®] também foram exportadas em formato TIFF (“Tagged Image File Format”) e analisadas pelo programa computacional Image J[®] (livre na internet).

O Image J[®] foi utilizado para avaliar a área irregular da tíbia que continha o defeito ósseo, calculando seu nível de densidade, em tons de cinza, e dos degraus da escada de alumínio. Novamente, os valores de densidade das tíbias foram convertidos para valores relativos à espessura em milímetros de alumínio (mmAl).

Ensaio Mecânico

Nos ensaios mecânicos foi utilizada máquina universal de ensaio EMIC[®], modelo DL 3000, pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da FOA /Unesp-Araçatuba, com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min.

Na análise biomecânica foi determinada a força máxima admitida pela tíbia e sua rigidez, 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.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Teste T de Student, pareado para comparar as tíbias tratadas e controle para cada grupo, com o programa computacional GraphPad InStat[®], versão 3.06.

Os resultados foram todos apresentados como média \pm desvio padrão. O nível de significância utilizado foi de 5% em todas as análises.

RESULTADOS

Densitometria Óssea

Os resultados da análise densitométrica, tanto pelo densitômetro de dupla emissão de raios - X (DXA) (Tabela 1) quanto pelo sistema digital Digora[®] (Tabela 2) e pelo software Image J[®] (Tabela 3), não demonstraram diferenças significantes ($p > 0,05$) entre as tíbias tratadas e controle de cada grupo, indicando assim que o US não interveio na quantidade mineral óssea.

Ensaio Mecânico

Os resultados do teste de flexão não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,05$) (Tabela 4) quando relacionadas às variáveis mecânicas: força máxima e rigidez das tíbias tratadas e controle sugerindo que o tratamento não interferiu nas propriedades mecânicas do terço médio da tíbia.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo concordam com Carvalho e Cliquet Jr (2003) que analisando a ação do US pulsado de baixa potência durante 20 dias consecutivos, por 20 minutos diários, na região proximal dos fêmures de ratas osteopênicas, evidenciaram uma melhora da arquitetura dos ossos (análise qualitativa), mas não do conteúdo mineral (análise quantitativa), supondo 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. Os autores comentam que a duração do tratamento com US de baixa potência talvez não tenha sido suficiente para possibilitar a total mineralização das regiões estimuladas, o que não possibilitou alterações de forma quantitativa, fato este que pode ter influenciado os resultados do presente trabalho, uma vez que usamos somente análises quantitativas.

Em trabalho realizado por Lirani (2004), foi evidenciada uma fase mais adiantada do reparo ósseo do grupo tratado com US em comparação ao grupo controle, no entanto, nos resultados quantitativos (ensaio mecânico) não foi observada maior carga máxima suportada pelos ossos tratados, o que concorda com os achados aqui apresentados. Isto talvez seja justificado pelo menor tempo de tratamento utilizado no presente trabalho e no de Lirani (2004), quando comparados com outros com maior tempo de aplicação do US (AZUMA et al., 2001; TAKIKAWA et al., 2001; WARDEN et al., 2006).

O estudo realizado por Warden et al. (2006) investigou o efeito do US sobre o reparo ósseo de fratura em fêmur de ratos tratados com US durante 16 e 27 dias; por 20 minutos. O grupo experimental de 25 dias não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os fêmures tratados e controle, nas análises densitométricas e

biomecânicas, diferentemente do grupo experimental de 40 dias, que teve um aumento de 14,3% no conteúdo mineral ósseo e 25,8% na área óssea (Análise densitométrica – DXA) ao comparar os fêmures tratados com os controles e um acréscimo também na força máxima (81,3%) e na rigidez (63,4%) (Análise Biomecânica – Ensaio Mecânico) nos fêmures tratados em relação aos controles. Estes achados reforçam a hipótese, de que no presente trabalho não foi encontrada influência do US de baixa potência, devido ao pequeno número de sessões de tratamento.

Neste trabalho, no momento da dissecação das tíbias observou-se uma diminuição da coloração na musculatura que envolvia a tíbia tratada, comparado com a da tíbia controle, sugestiva de necrose. Este dado sugere a necessidade da realização de um estudo direcionado à obtenção do efeito secundário do US pulsado de baixa potência, na musculatura adjacente à região óssea tratada.

CONCLUSÕES

O US de baixa potência nas condições experimentais deste trabalho não acelerou o processo de reparo ósseo.

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba (Protocolo nº 2007-002868). Data da Aprovação: 06/07/2007.

REFERÊNCIAS

AZUMA, Y.; ITO, M.; HARADA, Y.; TAKAGI, H.; OHTA, T.; JINGUSHI, S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. **J. Bone Miner. Res.**, v.16, n.4, p.671-680, 2001.

CARVALHO, D.C.L.; CLIQUET JUNIOR, A. Low intensity ultrasound effects over osteopenic female rats bones. **Acta Ortop. Bras.**, v.11, n.1, p.17-24, 2003.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng. Fract. Mech.**, v.17, n. 13/14, p.1809-1840, 2004.

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

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato.** 2004. 94f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. **Ver. Brás. Eng., Cad. Eng. Bioméd.**, v.14, n.2, p.37-47, 1998.

MARQUES, T.M. **Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio.** 2008. 45f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

MELO, L.G.N. **Avaliação do processo de reparo ósseo em cavidades cirúrgicas preenchidas com partículas de vidro bioativo associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio: estudo histomorfométrico em tíbias de rato.** 2003. 157f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

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.

NARUSE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; AZUMA, Y.; ITO, M.; OOTA, T.; KAMEYAMA, K.; ITOMAN, M. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.268, n. 1, p.216-220, 2000.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. **NIH Consensus Statement.** v.17, n.1, p.1-36, 2000.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. The worldwide problem of osteoporosis: insight afforded by epidemiology. **Bone**, v.17, suppl.5, p. 505S-511S, 1995.

RISO, N.D.M. **Influência do laser terapêutico no reparo de defeito ósseo de ratos submetidos à ausência de carga**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

SALZEDAS, L.M.P.; LOUZADA, M.J.Q.; OLIVEIRA FILHO, A.B. Radiopacity of restorative materials using digital images. **J. Appl. Oral Sci.**, v.14, n.2, p.147-152, 2006.

SHIMANO, M.M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos, após período de suspensão pela cauda e exercitação**. 2006. 89f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOUZA, A.F.A.; TUDURY, E.A. Displasia coxofemoral: diagnóstico clínico e radiográfico – revisão. **Ver. Clín. Vet.**, v.8, n.47, p.54-66, 2003.

TAKIKAWA, S.; MATSUI, N.; KOKUBU, T.; TSUNODA, M.; FUJIOKA, H.; MIZUNO, K.; AZUMA, Y. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **J. Ultrasound Méd.**, v.20, n. 3, p.197-205, 2001.

VICENTINI, C.R.; ROSA, R.A.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; SANTOS, P.H.; LOUZADA, M.J.Q. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos a ausência de carga e atividade física em esteira. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.1, p.62-71, 2007.

WARDEN, S.J.; FUCHS, R.K.; KESSLER, C.K.; AVIN, K.G.; CARDINAL, R.E.; STEWART, R.L. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. **Phys. Ther.**, v.86, n.8, p.1118-1127, 2006.

Efeito do Ultra-Som de Baixa Potência na Reparação Óssea em Ratos sob ausência de carga. Análise densitométrica e biomecânica.

Tabela 1 - Média e desvio padrão do Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) em gramas, Área em cm² e Densidade Mineral Óssea em g/cm² (DMO) observadas nas tíbias tratada e controle de ratos.

Tabela 1 – Mean and standard deviation of bone mineral content (BMC) in grams, area in cm² and bone mineral density (BMD) in g/cm² seen in tibiae treated and control rats.

| GRUPO GROUP | CMO (BMC) ¹ | | ÁREA ¹ | | DMO (BMD) ¹ | |
|----------------|------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL |
| 1 | 0,266 ± 0,035 | 0,283 ± 0,025 | 1,677 ± 0,098 | 1,766 ± 0,069 | 0,159 ± 0,018 | 0,160 ± 0,014 |
| 2 | 0,197 ± 0,016 | 0,183 ± 0,025 | 1,408 ± 0,118 | 1,271 ± 0,137 | 0,141 ± 0,010 | 0,145 ± 0,020 |
| 3 | 0,197 ± 0,034 | 0,217 ± 0,034 | 1,369 ± 0,118 | 1,453 ± 0,082 | 0,147 ± 0,029 | 0,150 ± 0,025 |

¹p > 0,05

Tabela 2 - Média e desvio padrão da Densidade Óssea (mmAl) observadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3; Análise realizada pelo sistema digital Digora[®]

Table 2 - Mean and standard deviation of bone density (mmAl) observed in the tibia of the rats treated and control groups of 1, 2 and 3; analysis conducted by the digital system Digora[®]

| GRUPO GROUP | DENSIDADE ÓSSEA (mmAl) ¹ BONE DENSITY (mmAl) | |
|----------------|--|---------------------|
| | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL |
| 1 | 1,17 ± 0,17 | 1,19 ± 0,10 |
| 2 | 1,43 ± 0,18 | 1,46 ± 0,28 |
| 3 | 1,12 ± 0,27 | 1,24 ± 0,23 |

¹p > 0,05

Tabela 3 - Média e desvio padrão da Densidade Óssea (mmAl), mensurada na área irregular da tíbia incluindo o defeito ósseo pelo software Image J[®], calculadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3.

Table 3 - Mean and standard deviation of bone density (mmAl), measured in the area including the irregular tibia bone defect by Image J[®], measured in the tibia of the rats treated and control groups of 1, 2 and 3.

| GRUPO GROUP | DENSIDADE ÓSSEA (mmAl) ¹ BONE DENSITY (mmAl) | |
|----------------|--|---------------------|
| | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL |
| 1 | 1,65 ± 0,23 | 1,53 ± 0,26 |
| 2 | 1,59 ± 0,30 | 1,61 ± 0,33 |
| 3 | 1,41 ± 0,13 | 1,39 ± 0,11 |

¹p > 0,05

Tabela 4 - Média e desvio padrão da Força Máxima (N) e Rigidez (x10³N/m) observadas na tíbia tratada e controle dos ratos dos grupos 1, 2 e 3.

Table 4 - Mean and standard deviation of maximum force (N) and stiffness (x10³N / m) observed in the tibia of the rats treated and control groups of 1, 2 and 3

| GRUPO GROUP | FORÇA MÁXIMA (N) MAXIMUM FORCE (N) | | RIGIDEZ (x10 ³ N/m) STIFFNESS (x10 ³ N/m) | |
|----------------|---------------------------------------|---------------------|--|---------------------|
| | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL | TRATADA TREATED | CONTROLE CONTROL |
| 1 | 68,66 ± 22,17 | 68,08 ± 14,92 | 151,41 ± 59,46 | 130,41 ± 51,82 |
| 2 | 49,51 ± 8,02 | 52,11 ± 7,99 | 130,82 ± 39,53 | 136,57 ± 18,03 |
| 3 | 72,19 ± 13,03 | 67,72 ± 16,75 | 161,11 ± 37,54 | 147,20 ± 32,59 |

p > 0,05

APÊNDICE B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

REVISTA CIENTÍFICA: Veterinária e Zootecnia – ISSN: 0102 - 5716
INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com: Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé; Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, que indicarão o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados; Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência; Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen: Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês. Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. Fotografias podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de desenhos originais, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor (modelos anexos).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem)

para fotografias, desenhos e mapas, em três vias (uma original e duas cópias) impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação.

Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½” de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

CITAÇÕES NO TEXTO

Geral: é normalizada segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas –ABNT/NBR 10520: <http://biblioteca.inpa.gov.br/NBR10520.htm> ou <http://www.creupi.br/biblioteca/normas.htm>

1 Citação no final do parágrafo: indica-se entre parênteses o sobrenome do autor em letras maiúsculas e ano.

1.1 Trabalho com um único autor: citar o sobrenome seguido de vírgula e o ano entre parênteses. Exemplo: (ALVES, 1999).

1.2 Vários trabalhos de autores diferentes: devem ser citados em ordem cronológica, crescente e separados por “;” (ponto e vírgula). Exemplo: (FONSECA, 1999; RAHAL, 2005).

1.3 Trabalho com dois autores no mesmo artigo: citar os sobrenomes de ambos separados pela conjunção “e”, acompanhados por vírgula e o ano. Exemplo: (SILVA e LOPES, 1998).

1.4 Trabalho com três autores: citar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al., e posteriormente vírgula e o ano. Exemplo: (CASTRO et al., 1998).

1.5 Trabalhos do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados por letra minúscula do alfabeto. Exemplo: (CASTRO, 1998b).

1.6 Vários trabalhos do mesmo autor: citar o sobrenome do autor e os anos em ordem cronológica. Exemplo: (FONTANA, 1996, 2000, 2003).

2 Citação no início do parágrafo: o sobrenome do autor deverá ter apenas a primeira letra em maiúscula e apenas a data entre parênteses.

2.1 Trabalho com um único autor: citar o sobrenome seguido de vírgula e o ano entre parênteses. Exemplo: Conforme Luna (1990), destacou-se...

2.2 Vários trabalhos de autores diferentes: devem ser citados em ordem cronológica, crescente e separados por “;” (ponto e vírgula). Exemplo: Segundo Fonseca (1999); Rahal (2005), o sistema de análise estatísticas...

2.3 Trabalho com dois autores no mesmo artigo: citar os sobrenomes de ambos separados pela conjunção “e”, acompanhados por vírgula e o ano. Exemplo: Para Silva e Lopes (1998), as enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos...

2.4 Trabalho com três autores: citar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al., e posteriormente vírgula e o ano. Exemplo: Conforme Castro et al. (1998), a cadeia produtiva da carne de aves no Brasil...

2.5 Trabalhos do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados por letra minúscula do alfabeto. Exemplo: Segundo Castro (1998b), estudos experimentais em cães comprovaram...

2.6 Vários trabalhos do mesmo autor: citar o sobrenome do autor e os anos em ordem cronológica. Exemplo: Avaliação de cultivares de Panicum maximum em pastejo, segundo Euclides (1996, 2000, 2003), possibilita...

REFERÊNCIA

1 Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva (a entidade é tida como autora)

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 12.ed. Washington, 1975. 1094p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas. Viçosa, 1997. 150p. (Manual do usuário- versão 7.1).

2 Livros

MODOLO, J.R. et al. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2003. 78p.

3 Capítulo de livro (autor do livro é o mesmo do capítulo)

CORRÊA, M.C.; CORRÊA, C.N.M. Estafilococias em geral. In:_____.
Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. pt.2, cap.8, p.91-103.

4 Capítulo de livro (autor do capítulo diferente do autor do livro)

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Artigo de revista

ANDRADE, S.F.; SAKATE, M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet. Not., v.10, n.2, p.1-15, 2004.

6 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

MALHADO, C.H.M. et al. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2004, Campina Grande. Anais... Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 2004. p.1-3

7 Teses e Dissertações

MORTARI, A.C. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães. 2004. 101f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

8 Citação de trabalhos publicados em CD ROM

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de Panicum maximum em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. Anais... São Paulo: Gnosis, 1999. CD-ROM. (Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020).

9 Publicações disponíveis na internet

VASCONCELOS, J.L.M. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Radares Técnicos-Reprodução, Campinas, 2004. p.1-2. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acesso