

Ana Cristina Kodama

**EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA
INTENSIDADE EM UM MODELO ÓSSEO DE
RATAS OVARECTOMIZADAS ANALISADOS POR
MEIO DO ENSAIO DE FLEXO-COMPRESSÃO.**

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

Orientador: Prof. Dr. João Manuel
Domingos de Almeida Rollo

**São Carlos
2003**

Dedico este trabalho aos meus pais Saeko e Kenitiro
pelo apoio e incentivo em todos os projetos da minha vida.

Meus eternos agradecimentos!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Manuel D. de Almeida Rollo, pelos valiosos ensinamentos, incentivos e apoio dado nos momentos em que mais precisei.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, pela inestimável participação na concretização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, que contribuiu fortemente nesta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva, pelas sugestões e ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao Nelson, que me auxiliou desde os primeiros contatos com os animais até as etapas experimentais finais.

Às secretárias Janete e Teresinha, sempre muito prestativas e dedicadas. À Melaine pela boa vontade sempre.

Ao Mário Gazziro, pela atenção e assistência nas calibrações do equipamento.

Ao Gercilei, pela orientação nas análises estatísticas.

À grande amiga Alessandra, companheira de estrada, que compartilhou todas as dificuldades e alegrias.

À todos os amigos da pós-graduação pelos bons momentos de convívio, em especial à Carla, Tatiana, Elizete, Ana Paula, Leandra e Taís, que de uma forma ou de outra me ajudaram.

Aos meus pais, por toda uma vida de amor e dedicação.

Aos meus queridos irmãos Flávio e Ulisses, pela assistência mesmo à distância e também por sua dedicação.

Ao meu namorado Edis, pelo amor e cumplicidade sempre.

À Deus.

RESUMO

KODAMA, A. C. (2003). *Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas analisados por meio do ensaio de flexo-compressão*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

O osso é um tecido dinâmico que remodela em resposta a um estímulo mecânico aplicado. O ultra-som pulsado de baixa intensidade consiste da propagação de ondas de energia mecânica e o propósito desta investigação foi analisar seus efeitos em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas por meio do ensaio de flexo-compressão. O estudo foi composto por 28 ratas *Wistar*, com peso médio de 251,4 gramas. Os animais foram divididos em 3 grupos: 10 animais ovariectomizados, tratados com ultra-som (grupo tratado), 9 animais ovariectomizados para controle (grupo ovariectomizado) e 9 animais intactos que não sofreram nenhum tipo de intervenção (grupo intacto). No grupo tratado as aplicações do ultra-som foram iniciadas no 1 dia após a cirurgia de ovariectomia, estendendo-se por 9 semanas, 6 dias por semana, durante 20 minutos diários. Por meio do ensaio de flexo-compressão, realizado na extremidade proximal dos fêmures, foi avaliado o limite máximo. A deformação do limite máximo não foi alterada nos diferentes grupos. No entanto, a média da carga do limite máximo do grupo ovariectomizado foi significativamente menor quando comparada com os grupos intacto e tratado, e entre os grupos intacto e tratado as médias não foram estatisticamente diferentes, sugerindo que apesar do grupo tratado também ter sido submetido à ovariectomia, a média da carga do limite máximo foi semelhante à do grupo intacto pela influência do ultra-som. Estes resultados fornecem indícios de que a perda de massa óssea provocou diminuição da carga do limite máximo e que a estimulação com ultra-som pulsado de baixa intensidade em fêmures de ratas ovariectomizadas contribuiu na preservação deste parâmetro mecânico.

Palavras-chave: ultra-som de baixa intensidade; ovariectomia; ratas; flexo-compressão.

ABSTRACT

KODAMA, A. C. (2003). *Low-intensity pulsed ultrasound effects on a bone pattern of ovariectomized female rats analyzed through flexion-compression test*. Dissertation (Mastership) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

Bone is a dynamic tissue, which remodels to applied mechanical stimuli. The low-intensity pulsed ultrasound consists on the propagation of waves of mechanical energy and the motivation of this study was to analyze its effects on a ovariectomized female rat bone model through flexion-compression test. The study was carried out with 28 female Wistar rats with 251,4 grams average weight. The animals were divided in 3 groups: 10 ovariectomized rats exposed to ultrasound (treated animals), 9 control ovariectomized animals (ovariectomized group) and 9 intact animals that did not suffer any kind of intervention (intact group). In the treated group, the ultrasound exposition was initiated on the first day after the surgery, and it was extended for 9 weeks, 6 days per week, during 20 minutes per day. Through the flexion-compression test, carried out on the femur's proximal extremity, the maximum limit was evaluated. The maximum limit deformation wasn't altered in these different groups. Though, the maximum limit load average in the ovariectomized group was significantly lower when compared to the intact and treated groups, and between the intact and treated groups, the average wasn't statistically different, suggesting that despite of the treated group was submitted to ovariectomy, the average value of the load maximum limit was similar to the intact group by the ultrasound influence. These results were indications that the loss of bone mass caused the load maximum limit decreasing and that the low-intensity pulsed ultrasound stimulation on femurs of ovariectomized female rats contributed to the preservation of this mechanical parameter.

Key words: low-intensity ultrasound; ovariectomy; rats; flexion-compression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação do osso cortical e trabecular.....	6
FIGURA 2 – Ciclo de remodelamento ósseo: A) em osso trabecular; B) em osso cortical.....	9
FIGURA 3 – Ilustração de osso trabecular: A) normal; B) osteoporótico.....	11
FIGURA 4 – Microestrutura que mostra a presença de formação de calos ao redor de microfraturas no osso trabecular do colo femoral (como indicada pelas setas). Pode-se observar que as microfraturas são mais evidentes nas trabéculas verticais.....	13
FIGURA 5 – Locais mais acometidos por fraturas osteoporóticas: 1) coluna vertebral, 2) extremidade proximal do fêmur, 3) extremidade distal do rádio...	14
FIGURA 6 – Extremidade proximal do fêmur de rato: 1) cabeça femoral, 2) colo femoral, 3) trocânter maior.....	34
FIGURA 7 – A) Local da incisão para acesso ao ovário; B) exposição do ovário para sua posterior retirada.....	35
FIGURA 8 – Retirada do ovário.....	35
FIGURA 9 – Equipamento de ultra-som de baixa intensidade utilizado para o tratamento: 1) chave geral liga/desliga; 2) mostrador analógico indicativo de potência; 3) <i>led</i> que indica que o aparelho está atuando no modo pulsado; 4) <i>led</i> indicador do término do tratamento; 5) transdutor de PZT e adaptador para encaixar na mesa de tratamento.....	36
FIGURA 10 – Características do ultra-som.....	37
FIGURA 11 – Animais colocados na mesa para aplicação do ultra-som, com o cabeçote sob as extremidades proximais dos fêmures de ambas as patas.....	37
FIGURA 12 – A) Fêmur (metade distal) incluído na resina acrílica para a realização do ensaio de flexo-compressão; B) 1-suporte de latão utilizado para inclusão do osso na resina acrílica; 2-molde de alumínio; 3-elástico.....	38
FIGURA 13 – Ensaio mecânico de flexo-compressão, com aplicação da carga na cabeça femoral. Acessório de aplicação côncavo para melhor distribuição da carga aplicada.....	40
FIGURA 14 – Exemplo de gráfico carga versus deformação, ilustrando o limite máximo (LM) com a sua carga e deformação correspondente.....	41
FIGURA 15 – Média do peso inicial dos animais de todos os grupos.....	43

FIGURA 16 – Média do peso final dos animais de todos os grupos.....	44
FIGURA 17 – Média do peso dos fêmures de todos os grupos.....	45
FIGURA 18 – Média do comprimento dos fêmures de todos os grupos.....	46
FIGURA 19 – Curvas carga versus deformação dos 16 ossos analisados do grupo intacto.....	47
FIGURA 20 – Curvas carga versus deformação dos 15 ossos analisados do grupo ovariectomizado.....	47
FIGURA 21 – Curvas carga versus deformação dos 16 ossos analisados do grupo tratado.....	48
FIGURA 22 – Média da carga do limite máximo de todos os grupos.....	49
FIGURA 23 – Média da deformação do limite máximo de todos os grupos.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Médias e desvios padrão do peso corporal inicial e final dos animais de cada grupo.....	43
TABELA 2 – Valores médios e desvios padrão do peso e comprimento dos fêmures.....	45
TABELA 3 – Médias e desvios padrão do limite máximo (LM) dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mW/cm ²	mili watts por centímetro quadrado
MHz	mega hertz
μs	micro segundos
kHz	quilo hertz
μm	micrometro
Hz	hertz
ms	mili-segundos
W	watt
W/cm ²	watt por centímetro quadrado
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
kgf	quiilograma-força
mm	milímetro
N	newton
mm/min	milímetro por minuto
m	metro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
	representa que o número que o acompanha é ordinal
®	marca registrada

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 O osso	4
3.1.1 Estrutura óssea	5
3.1.2 Células ósseas	7
3.1.3 Remodelamento ósseo	8
3.1.4 Propriedade elétrica do tecido ósseo	10
3.2 Osteoporose	11
3.2.1 Patogênese da osteoporose	16
3.2.2 Tratamentos	18
3.2.3 A perda de massa óssea em ratas	20
3.2.4 A influência da perda óssea na avaliação biomecânica	21
3.3 Ultra-som Pulsado de Baixa Intensidade	23
3.3.1 Características do ultra-som	23
3.3.2 Aplicações clínicas e em animais do ultra-som pulsado de baixa intensidade	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Os animais do experimento	33
4.2 Grupos experimentais	33
4.3 O osso escolhido	34

4.4 Procedimento cirúrgico	34
4.5 Ultra-som	36
4.6 Inclusão do osso na resina	38
4.7 Métodos de avaliação	39
4.7.1 Peso corporal	39
4.7.2 Ensaio de flexo-compressão	39
4.8 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Peso dos animais	43
5.2 Peso e comprimento dos fêmures	44
5.3 Curvas carga versus deformação	46
5.3.1 Carga do limite máximo	49
5.3.2 Deformação do limite máximo	50
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO A	73
ANEXO B	74
ANEXO C	76

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido metabolicamente ativo e sob condições normais de remodelamento, a formação óssea e a reabsorção no esqueleto adulto são formidavelmente acopladas de maneira que a formação óssea final equivale à sua reabsorção final (KAPLAN, 1995).

Alterações nessa homeostasia esquelética podem ocorrer por vários fatores e são conhecidas como doenças ósseas metabólicas (KAPLAN et al., 1994).

A osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum, caracterizada pela densidade diminuída do osso normalmente mineralizado. Como o nome indica, o osso torna-se anormalmente poroso e fino. A massa óssea reduzida enfraquece a força mecânica suportada pelo osso, tornando-o assim muito mais fácil de se fraturar, freqüentemente com pequeno ou nenhum trauma (KAPLAN, 1995).

Nas últimas duas décadas a osteoporose foi amplamente reconhecida como um problema de saúde pública (OSTEOPOROSE..., 1997) e pode adquirir proporções ainda mais preocupantes devido à previsão do aumento do número de idosos e as crescentes incidências de fraturas osteoporóticas (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991).

Desta forma, destaca-se a importância da prevenção e de tratamentos para a perda de massa óssea. Além dos tratamentos existentes, que são predominantemente farmacológicos, outras formas de tratamentos não invasivos, não medicamentosos, como por exemplo o ultra-som pulsado de baixa intensidade, poderão se tornar aliados no combate da perda óssea.

O ultra-som pulsado de baixa intensidade consiste da propagação de ondas de energia mecânica (LEWIN e ZISKIN, 1993). O tratamento potencial da perda óssea por este recurso é baseado em princípios biomecânicos, pois o

osso é um tecido dinâmico que remodela em resposta a um estímulo mecânico aplicado (WARDEN et al., 2001b).

A efetividade do ultra-som pulsado de baixa intensidade, como um estimulador mecânico osteogênico, está clara em casos de pseudoartroses e fraturas. Outras aplicações do ultra-som em estruturas ósseas têm sido pesquisadas, como em artrodese (GAMA, 2002; GLAZER et al., 1998) e alongamento ósseo (SHIMAZAKI et al., 2000), com resultados promissores.

A influência do ultra-som na osteopenia e osteoporose foi pouco estudada e existe contradição nos resultados obtidos. Desta forma, é importante explorar mais a sua atuação potencial na perda de massa óssea.

Para analisar as respostas ósseas aos novos tratamentos da perda de massa óssea, assim como para estudar as repercussões da deficiência do hormônio ovariano sobre o sistema esquelético, pode ser utilizado o modelo de ratas ovariectomizadas, que possui grande aceitação.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do ultra-som pulsado com intensidade baixa de $38,7 \text{ mW/cm}^2$, frequência fundamental de 1,5 MHz, largura do pulso de 200 μs e frequência de pulsos de 1,0 kHz, em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas por meio do ensaio de flexo-compressão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Osso

O osso é um tecido conjuntivo dinâmico que provê suporte para o corpo contra forças externas (gravidade), age como um sistema de alavancas para transferir forças musculares, fornece proteção para órgãos internos vitais, além de possuir funções fisiológicas atuando como reservatório de íons (homeostasia mineral) e na formação de células sanguíneas (hematopoiese) (NIGG e GRIMSTON, 1994).

Constitui-se de elementos orgânicos (células e matriz) e de elementos inorgânicos (minerais). Em relação ao peso, aproximadamente 70% do tecido correspondem ao componente inorgânico, a água compreende de 5 a 8% e a matriz orgânica compõe o restante, em torno de 22 a 25% (EINHORN, 1996a). A matriz orgânica é constituída principalmente por colágeno (95%) e por proteínas não colagenosas, já o componente inorgânico consiste de hidroxiapatita, um mineral macro-cristalino insolúvel, inicialmente depositado na matriz orgânica como sais de fosfato de cálcio e, mais tarde transformado em cristais de apatita (KAPLAN, 1995).

A maior parte do cálcio é armazenada no osso, ou seja, 99% do cálcio total do corpo encontram-se no esqueleto. Outros minerais como o fósforo, sódio, potássio e magnésio também são armazenados na estrutura óssea. O cálcio é fundamental para vários processos metabólicos vitais e a manutenção de sua homeostasia no plasma tem mais prioridade que a necessidade de cálcio do osso. Entre os hormônios que regulam o balanço de cálcio no plasma estão os hormônios de crescimento, reprodutivos, paratireoideano, calcitonina e a vitamina D (NIGG e GRIMSTON, 1994).

Os minerais depositados no osso são os responsáveis pela força suportada pelo osso, sua dureza e rigidez, enquanto as fibras de colágeno estão relacionadas com a flexibilidade do osso.

3.1.1 Estrutura óssea

O esqueleto adulto humano é constituído por 206 ossos, que variam na sua forma, tamanho e posição. A classificação dos ossos mais comum é aquela baseada na sua forma e, assim, tem-se a divisão do esqueleto em ossos longos, planos, curtos, irregulares, pneumáticos e sesamóides (DÂNGELO e FATTINI, 2002).

Os ossos longos são aqueles que apresentam um comprimento consideravelmente maior que a largura e espessura como, por exemplo, o fêmur, a tibia, o úmero e as falanges. Os ossos planos são os que apresentam comprimento e largura equivalentes, com pequena espessura. Os ossos do crânio e a escápula constituem-se em exemplos deles.

Quando o comprimento, largura e espessura são equivalentes, os ossos são denominados de curtos, como o é caso dos ossos do carpo e do tarso. Existem também ossos que não encontram correspondência em formas geométricas conhecidas e são classificados como ossos irregulares, como as vértebras.

A presença de cavidades contendo ar é característica de alguns ossos do crânio, como o frontal, sendo estes denominados de pneumáticos. Alguns tendões ou cápsula fibrosa desenvolvem na sua substância ossos sesamóides. A patela é um exemplo típico de osso sesamóide intratendíneo.

Apesar dos vários formatos e tamanhos dos ossos, existe uma outra classificação macroscópica que divide o esqueleto em dois componentes estruturais: osso cortical e osso esponjoso (Figura 1).

Também denominado de compacto, o osso cortical é um material denso encontrado nas paredes das diáfises e recobrimdo as superfícies externas de ossos (NIGG e GRIMSTON, 1994). É limitado externamente pelo perióstio, que é importante durante o crescimento e reparo de fraturas, e na sua porção interna, pelo endóstio.

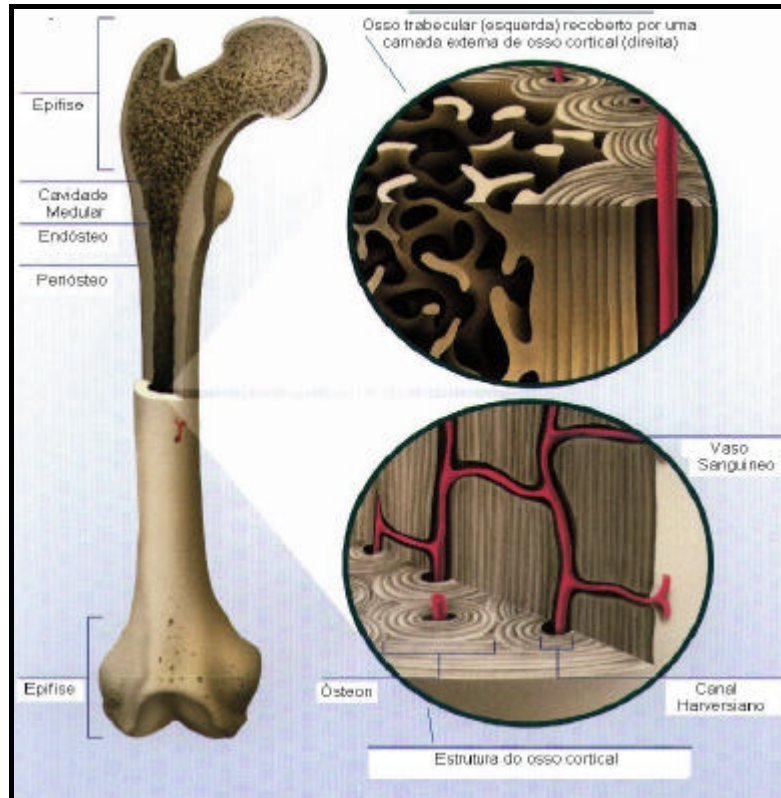


Figura 1- Representação do osso cortical e trabecular.

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

Acesso em: 26 set. 2003.

O osso cortical corresponde a 80% do volume do esqueleto enquanto o osso esponjoso corresponde a apenas 20%. Apesar desta predominância, apenas 50% da atividade metabólica ocorrem no osso cortical. Os sistemas Harversianos (ósteons), que compõem o osso cortical, são constituídos por elementos tubulares compostos por lamelas dispostas concentricamente ao redor de um canal central (Harversiano) contendo vasos sanguíneos. A menor atividade metabólica do osso cortical é devido a sua organização espacial em sistemas Harversianos que fornece uma superfície coberta por células relativamente pequena, em contraste com o osso esponjoso que possui uma grande superfície coberta por células.

O osso esponjoso, ou trabecular, consiste de trabéculas com espessura variando entre 50 a 400 μm (ERIKSEN et al., 1993), e possui, entre as trabéculas, espaços irregulares ligados entre si, reduzindo assim o peso do osso (NIGG e GRIMSTON, 1994). As trabéculas se interconectam formando uma rede adequada para resistir às cargas mecânicas (OSTEOPOROSE..., 1997). O osso trabecular é encontrado nos corpos vertebrais, nas epífises de

ossos longos, em ossos curtos e entre as duas camadas de osso compacto que formam os ossos planos (NIGG e GRIMSTON, 1994).

3.1.2 Células ósseas

O osso é composto por quatro tipos diferentes de células: os osteoblastos, os osteoclastos, as células ósseas de revestimento e os osteócitos. Os três primeiros tipos celulares estão presentes na superfície óssea e os osteócitos ficam no interior da matriz mineralizada. Células osteoprogenitoras locais dão origem aos osteoblastos, osteócitos e às células ósseas de revestimento, enquanto os osteoclastos são formados a partir da fusão de precursores mononucleares (MARKS e HERMEY, 1996). Diversos fatores induzem o processo de diferenciação de células ósseas, entre eles incluem as proteínas morfogenéticas do osso, fatores de crescimento e citocinas (KAPLAN et al., 1994).

Os osteoblastos possuem um aparelho de Golgi proeminente e um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, e têm como função a formação de osso, sendo responsáveis pela produção da matriz óssea. Secretam o colágeno tipo I e proteínas não colagenosas da matriz óssea (MARKS e HERMEY, 1996).

Após a síntese e liberação do colágeno para o espaço extracelular adjacente pelos osteoblastos, as fibrilas de colágeno se alinham em arranjos regulares e produzem a matriz orgânica chamada de osteóide. No interior do osteóide, o íon cálcio é depositado como massas amorfas de fosfato de cálcio. A seguir, íons hidróxido e bicarbonato são gradualmente adicionados à fase mineral e cristais de hidroxiapatita maduros são formados (LIAN e STEIN, 1996).

O osteoblasto após ser envolto pela matriz óssea, que se torna mineralizada, é chamado de osteócito. Os osteócitos e osteoblastos tem processos celulares extensos que projetam dentro de canaliculos que estabelecem contato e comunicação entre osteócitos adjacentes e canais centrais de ósteons. A distribuição dos osteócitos, assim como a ligação existente entre eles, indica que existe uma organização para servir como um

sistema que ajuda na comunicação de sinais de força e deformação e na regulação do metabolismo do tecido (KAPLAN et al., 1994).

Células de revestimento ósseo são células alongadas e inativas, possuem poucas organelas citoplasmáticas e recobrem a superfície óssea. A função dessas células ainda é pouco conhecida, mas tem sido especulado que as células de revestimento podem ser precursores de osteoblastos (MARKS e HERMEY, 1996).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea, ou seja, realizam a digestão da matriz mineral e orgânica. Seu citoplasma contém abundantes mitocôndrias, vacúolos e vesículas envolvidas no processo de reabsorção óssea. Componentes como o cálcio e o fosfato, durante o processo de reabsorção óssea, são liberados para a circulação ou são utilizados localmente como agentes de acoplamento entre a formação e a reabsorção óssea (OSTEOPOROSE..., 1997).

3.1.3 Remodelamento ósseo

O remodelamento ósseo caracteriza-se por ser um processo cíclico, responsável pela renovação do osso ao longo da vida e, desta forma, preserva a integridade mecânica do esqueleto (ERIKSEN et al., 1993). Estima-se que no adulto aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical sejam renovados anualmente (DEMPSTER, 1995).

O fenômeno de remodelamento ocorre em discretas unidades, e o seu início, chamado de ativação, depende da retração das células de revestimento que normalmente recobrem a superfície do osso. Com a superfície livre ocorre a fixação de precursores mononucleados de osteoclastos, que se unem para dar origem aos osteoclastos diferenciados. Estes realizam a reabsorção óssea por um período acima de uma ou duas semanas, e depois de completada essa fase, os osteoclastos deixam o local de reabsorção e são substituídos por células mononucleares que auxiliam no preparo das superfícies lacunares para a formação do novo osso e convocam os precursores de osteoblastos. Inversão é o nome que se dá a essa fase, visto que a região de reabsorção torna-se de formação óssea. Com a presença dos osteoblastos ocorre o

preenchimento das cavidades deixadas pelos osteoclastos com matriz orgânica nova, também conhecida como osteóide, que após 25 a 30 dias torna-se mineralizada (DEMPSTER e LINDSAY, 1993). A mineralização do osteóide começa rapidamente, de forma que 3/4 são mineralizados dentro de poucos dias. No entanto, são necessários alguns meses para o osteóide tornar-se completamente mineralizado (KANIS, 1996). O ciclo completo de remodelamento (Figura 2) é de alguns meses (DEMPSTER e LINDSAY, 1993).

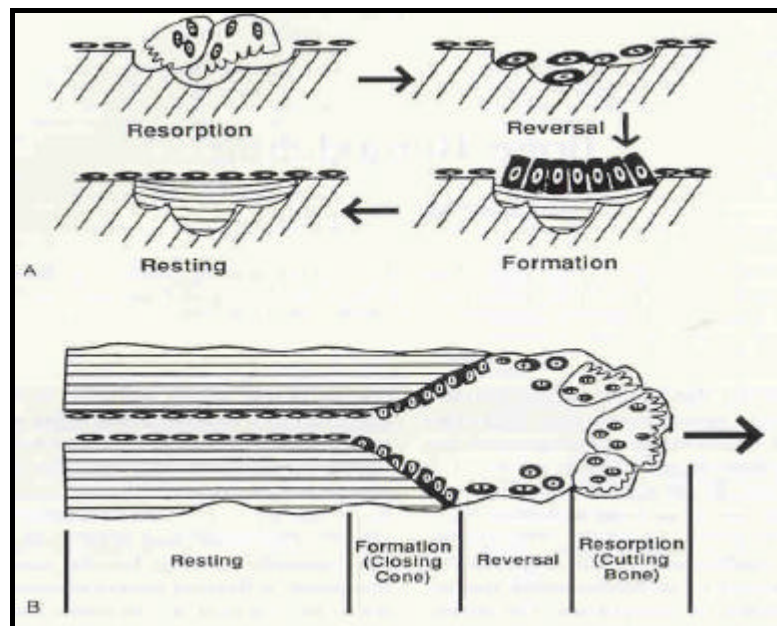


Figura 2- Ciclo de remodelamento ósseo: A) em osso trabecular; B) em osso cortical.
Fonte- DEMPSTER, D.W. (1995)

A sincronia entre as atividades celulares osteoblásticas e osteoclásticas denomina-se fenômeno de acoplamento e garante a reposição do osso durante a formação óssea subsequente à remoção (ERIKSEN et al., 1993). Acredita-se que certos componentes auxiliam nesse acoplamento como as proteínas quimiotáticas e morfogenéticas (fatores de crescimento) liberadas durante a reabsorção óssea. Essas proteínas são capazes de recrutar células osteoprogenitoras para os sítios de formação óssea e induzir a diferenciação até osteoblastos e osteócitos (OSTEOPOROSE..., 1997). O estímulo mecânico de células ósseas também parece importante nesse processo de acoplamento (ERIKSEN et al., 1993).

3.1.4 Propriedade elétrica do tecido ósseo

A estrutura, a organização e o remodelamento ósseo são determinados, pelo menos parcialmente, por meio mecânico (EINHORN, 1996b). A osteoporose por desuso, caracterizada pela perda de massa óssea em decorrência de inatividade muscular e redução de carga no osso (UHTHOFF e JAWORSKI, 1978), é um exemplo claro da necessidade de estímulos mecânicos para manutenção do metabolismo mineral ósseo normal.

O osso, ao receber um estímulo mecânico, gera potenciais elétricos de dois tipos: o potencial de corrente (ou fluxo) e o potencial piezoelétrico. A geração desses potenciais representa a conversão direta da energia mecânica em energia elétrica, fenômeno este conhecido como piezoeletricidade (KAPLAN et al., 1994).

A piezoeletricidade do osso foi descoberta em 1957 por Fukada. O efeito piezoelétrico direto é aquele observado em um material, quando este material produz, sob carga mecânica, uma polarização elétrica, convertendo, portanto, a energia mecânica em energia elétrica. A piezoeletricidade inversa ocorre quando o processo é invertido, isto é, se for aplicado um campo elétrico a um material piezoelétrico, este se deformará mecanicamente (XAVIER e DUARTE, 1983).

Assim, ao se aplicar uma carga mecânica no osso, ocorre a deformação nos componentes orgânicos do material (a matriz orgânica do osso é composta principalmente por colágeno), que gera potenciais elétricos (KAPLAN et al., 1994). Os potenciais elétricos funcionam como um sistema sinalizador para as células adjacentes (os osteoblastos e os osteoclastos), instruindo-as a aumentar/ diminuir a formação do tecido, ou a aumentar/ diminuir a absorção de tecido, como uma resposta ao estímulo mecânico imposto (CHARMAN, 1996). Este é o mecanismo de geração do potencial piezoelétrico.

O potencial de corrente, também gerado em decorrência da aplicação de um estímulo mecânico, resulta do fluxo do fluido eletrolítico produzido pela deformação do material. Esse tipo de potencial pode ser detectado pelos osteócitos (KAPLAN et al., 1994), que são considerados as principais células mecanosensitivas do osso. Ao se aplicar uma força sobre o osso, ocorre um

fluxo de fluido no sistema canalicular, que estimula os osteócitos a produzirem fatores que, por sua vez, estimulam o metabolismo ósseo (KLEIN-NULEND et al., 1995 *apud* EINHORN, 1996b).

3.2 Osteoporose

O envelhecimento populacional está se dando de forma extremamente rápida, de modo que, a proporção de idosos em 2050 deverá alcançar 15% da população, segundo estimativas (CHAIMOWICZ, 1997). Com isso, a incidência de múltiplas doenças associadas com a idade avançada, como a osteoporose, tenderá a aumentar (CARNEIRO, 2000).

Osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada por redução da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, que leva a um aumento da fragilidade óssea e a um conseqüente aumento do risco de fratura (Figura 3) (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991).

A osteopenia, ou massa óssea reduzida, significa um osso ou esqueleto com menos tecido ósseo que o normal (FROST e JEE, 1992).

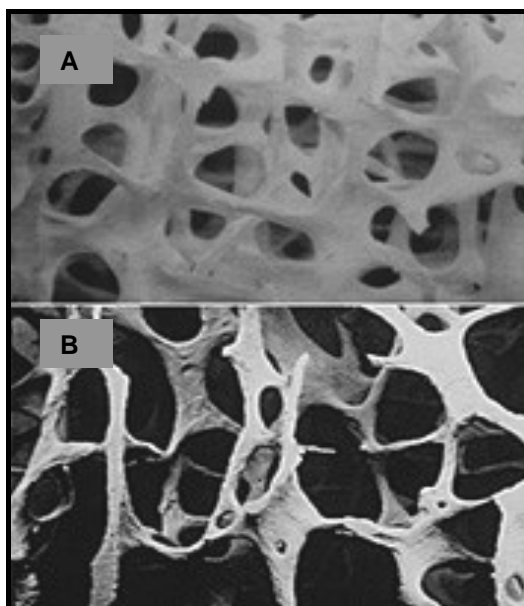


Figura 3- Ilustração de osso trabecular: A) normal; B) osteoporótico.
Fonte- Disponível em: <<http://www.med.uni-jena.de/.../sprechtunde.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2003.

Além de ser responsável por um elevado número de mortalidade e morbidade, a osteoporose causa ao ser humano não só problemas relacionados à saúde, mas também problemas de caráter sócio-econômico, envolvendo muitos gastos médicos (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991).

No Brasil esta patologia atinge 25% a 30% das mulheres brancas durante a pós-menopausa e 40% a 60% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade (CARNEIRO, 2001).

Estimativas mostram que esta doença afeta 75 milhões de pessoas nos Estados Unidos, Europa e Japão, acometendo uma a cada três mulheres após a menopausa e a maioria dos idosos (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991). Com o aumento da expectativa de vida da população estima-se que o número de indivíduos americanos com osteoporose aumentará de 28 milhões para 41 milhões em 2015 (HIGHTOWER, 2000).

Clinicamente, a osteoporose sem fratura associada geralmente não apresenta sintomas (AVIOLI e KLEEREKOPER, 1998), sendo também conhecida como epidemia silenciosa ou ladrão silencioso (KANIS, 1996). Quando a osteoporose é complicada por uma fratura, os sintomas são decorrentes da fratura em si (AVIOLLI e KLEEREKOPER, 1998). As microfraturas, provenientes de microdanos, também podem ser as responsáveis pela queixa de dor na osteoporose (GALI, 2001).

Tem-se mostrado que microdanos ocorrem no esqueleto e que eles podem contribuir para a fragilidade óssea (JOHNSTON e SLEMENDA, 1995). Os microdanos ocorrem em qualquer material estrutural quando este é submetido a cargas submáximas repetidas (RECKER, 1996).

O processo de remodelamento ósseo é o mecanismo pelo qual o osso pode reparar a região lesada sem perda de sua integridade estrutural. No entanto, com o envelhecimento ou certas doenças, pode ocorrer o acúmulo de microdanos não reparados, e desta forma aumentar a fragilidade óssea (NAGARAJA, LAIB e GULDBERG, 2003), levando a diminuição da competência mecânica do osso.

Ainda não se sabe quanto da fragilidade do esqueleto na osteoporose é devido à acumulação de quantidades excessivas de microdanos (RECKER, 1996). Acredita-se que em pacientes osteoporóticos, o esqueleto possui um

risco maior de sofrer microdanos. Com a diminuição da massa óssea as tensões induzidas pelas atividades são maiores (KANIS, 1996) e certas mudanças no remodelamento presentes nesses pacientes poderiam resultar em uma reparação ineficaz ou retardada dos microdanos.

Provavelmente o início dos microdanos é a nível molecular e posteriormente podem tornar-se fendas que se propagam (RECKER, 1996). As fendas podem atravessar as estruturas trabeculares e gerar microfraturas, sendo estas encontradas mais freqüentemente em ossos osteoporóticos. Na coluna, as microfraturas são preferencialmente encontradas nas trabéculas verticais, presumivelmente devido ao aumento de suporte de tensão pelas trabéculas residuais (KANIS, 1996). As microfraturas são caracterizadas pela presença de microcalos, que são similares aos das fraturas de ossos longos (Figura 4) (KAPLAN et al, 1994).

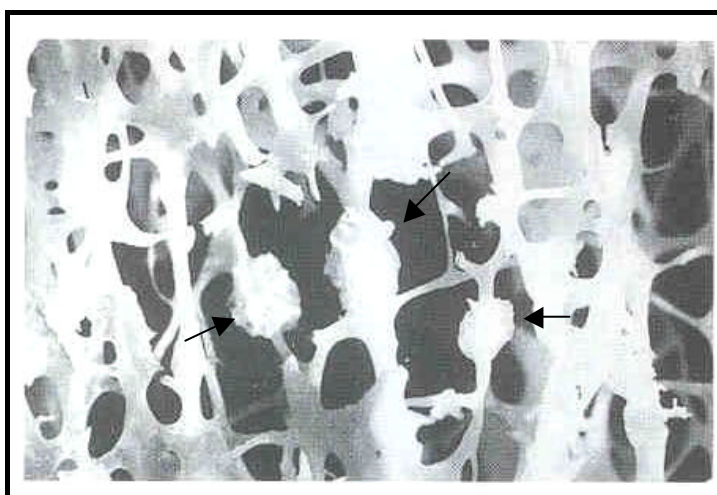


Figura 4 Microestrutura que mostra a presença de formação de calos ao redor de microfraturas no osso trabecular do colo femoral (como indicada pelas setas). Pode-se observar que as microfraturas são mais evidentes nas trabéculas verticais.

Fonte- KANIS, J.A. (1996)

As fraturas osteoporóticas afetam um grande segmento da população e os locais mais freqüentemente acometidos são a coluna vertebral, a extremidade distal do rádio e a extremidade proximal do fêmur (Figura 5) (RENNÓ et al., 2001).

As fraturas de vértebras muitas vezes ocorrem espontaneamente ou decorrente de um trauma mínimo como numa ação de levantar ou durante uma

tosse (KANIS, 1996) e pode levar a perda de estatura, cifose e dor crônica nas costas (DEMPSTER e LINDSAY, 1993).

Em geral, as fraturas do terço distal do rádio são causadas por uma queda sobre a mão estendida e raramente são fatais ou necessitam hospitalização. No entanto são fraturas dolorosas, que normalmente requerem uma ou mais reduções e necessitam ser estabilizadas com gesso (KANIS, 1996).

A fratura osteoporótica mais severa é a do terço proximal do fêmur, responsável pela maior parte da mortalidade e morbidade da osteoporose, sendo a principal causa de incapacidade na idade avançada (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991). Uma média de 24% dos pacientes com fraturas de quadril e com mais de 50 anos morre dentro de um ano após a fratura, 25% dos pacientes com fratura de quadril requerem cuidados especiais por longo prazo e somente um terço recupera inteiramente o nível de independência igual ao que possuía antes da fratura (GALI, 2001). Acima de 90% das fraturas de quadril estão associadas com quedas a partir da posição em pé (HAYES e MYERS, 1995).

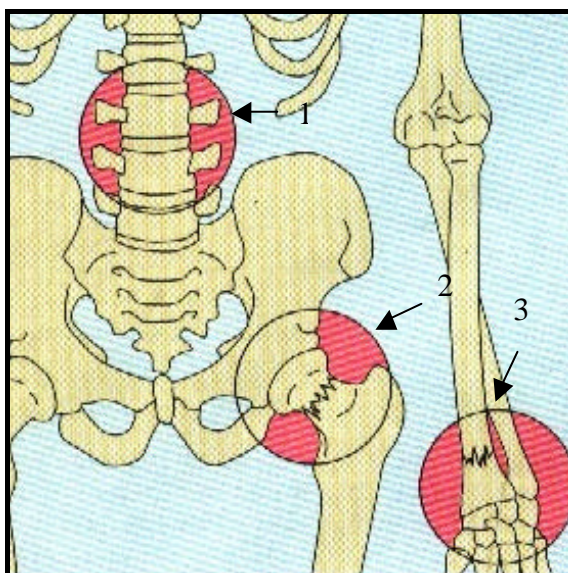


Figura 5- Locais mais acometidos por fraturas osteoporóticas: 1) coluna vertebral, 2) extremidade proximal do fêmur, 3) extremidade distal do rádio.
Fonte- PEEL e EASTELL (1995)

Apesar da osteoporose atingir ambos os sexos, as fraturas osteoporóticas são mais comuns nas mulheres devido ao seu menor pico de

massa óssea em relação aos homens, à perda acelerada de massa óssea a partir da menopausa, à maior probabilidade de queda nas mulheres acima dos 70 anos de idade e também em decorrência da maior longevidade das mulheres (OSTEOPOROSE..., 1997).

A densidade óssea é o principal determinante do risco de fratura de um indivíduo (PEEL e EASTELL, 1995). Para evitar os efeitos potencialmente devastadores da osteoporose é preciso avaliar, especialmente antes que qualquer fratura e deformidade ocorram, a densidade óssea em pacientes de alto risco (KAPLAN, 1995), como mulheres com deficiência estrogênica, evidências de anormalidades vertebrais, pacientes submetidos à terapia com glicocorticóide por tempo prolongado e pacientes com hiperparatireoidismo primário ou outras doenças associadas com alto risco desenvolver a osteoporose. A realização da densitometria óssea também é importante para monitorar mudanças na massa óssea em decorrência de uma terapia medicamentosa para tratamento da osteoporose (IQBAL, 2000).

Existem muitas técnicas para medida da densidade mineral óssea, as mais usadas incluem as densitometrias de fóton único (SPA) e de duplo fóton (DPA), as densitometrias de energia única de raios-x (SXA) e de dupla energia de raios-x (DXA), tomografia computadorizada quantitativa e ultra-som quantitativo (IQBAL, 2000). Atualmente a DXA é a mais empregada (GALI, 2001).

A maioria das técnicas densitométricas fornece a densidade mineral óssea expressa em g/cm^2 para uma região de interesse. A densidade mineral óssea obtida é classificada de acordo com os desvios padrão da média do adulto jovem de referência. A comparação da densidade mineral óssea com a população harmonizada, ou seja, do mesmo sexo, raça, idade e peso do paciente estudado, mostra como esta densidade se apresenta em função do que ela deveria ser no momento da realização do exame (OSTEOPOROSE..., 1997).

Para interpretação dos resultados da densitometria óssea, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu 4 categorias diagnósticas para mulheres (WHO, 1994):

- Normal: o valor da densidade mineral óssea (DMO) ou conteúdo mineral ósseo (CMO) encontra-se dentro de 1,0 desvio padrão da média do adulto jovem de referência.
- Osteopenia: o valor de DMO ou CMO está entre 1,0 e 2,5 desvios padrão abaixo da média do adulto jovem.
- Osteoporose: o valor de DMO ou CMO encontra-se 2,5 desvios padrão ou mais abaixo da média do adulto jovem.
- Osteoporose severa: o valor de DMO ou CMO encontra-se mais que 2,5 desvios padrão abaixo da média do adulto jovem na presença de uma ou mais fraturas por trauma mínimo.

3.2.1 Patogênese da osteoporose

A perda de massa óssea relacionada à idade, que ocorre em ambos os sexos, e a perda óssea que ocorre após a menopausa são as principais causas da osteoporose. O osso é um tecido metabolicamente ativo, sendo continuamente remodelado durante a vida adulta por um equilíbrio dinâmico entre os osteoclastos e os osteoblastos. Na osteoporose há um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea (MANOLAGAS e JILKA, 1995).

Entretanto a quantidade de massa óssea de um indivíduo idoso não está relacionada somente com a perda de massa óssea durante o final da vida adulta, mas também é dependente da massa óssea adquirida até a maturidade. Além desses fatores, certas condições ou doenças, como exposição excessiva a glicocorticóides, hipertireoidismo, mieloma múltiplo e imobilização, podem levar à perda de massa óssea e causar osteoporose (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991).

O pico de massa óssea é a quantidade máxima de massa óssea que o indivíduo acumula desde o nascimento até a maturidade do esqueleto (OTT, 1990), e há contradições em relação ao momento em que o pico de massa óssea é atingido. Alguns acreditam que seja próximo dos vinte anos enquanto outros sugerem que ele seja alcançado em torno da terceira ou quarta décadas de vida (KANIS, 1996). Diversos fatores influenciam a obtenção do pico de massa óssea, podendo levar a formação de um baixo pico e predispor o

indivíduo à osteoporose. Entre os fatores estão os genéticos, os raciais, a dieta alimentar e a atividade física (CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL, 2001).

O hormônio estrógeno possui importante função na homeostase do esqueleto, regulação da frequência de novos ciclos de remodelamento e no equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (LINDSAY, 1995). Os osteoblastos possuem receptores de estrógeno e com a ligação receptor-hormônio ocorre a liberação de mediadores químicos que inibem a atividade de osteoclastos (IQBAL, 2000).

A deficiência estrogênica causa aumento da ativação da frequência de novos ciclos de remodelamento (KANIS, 1996), torna os osteoclastos hiperativos e capazes de penetrar profundamente dentro de placas esponjosas, perfurando-as (DEMPSTER e LINDSAY, 1993). Assim, com a diminuição deste hormônio, as trabéculas ósseas ficam mais separadas, mais porosas, com a conectividade reduzida, e a diminuição na espessura do osso cortical que ocorre de forma gradual com o avançar da idade é acelerada (DEMPSTER, 1995).

O esqueleto torna-se mais sensível ao hormônio paratireóideo com a deficiência estrogênica e isso também pode explicar a perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa (IQBAL, 2000). Há muitas evidências que sugerem que a produção anormal de interleucina-6, que é um fator capaz de estimular atividade e o desenvolvimento de osteoclastos, pode estar associada com um aumento na reabsorção de massa óssea na osteoporose por deficiência estrogênica (KANIS, 1996).

Ao contrário da perda óssea após a menopausa que está associada a uma excessiva atividade osteoclástica, a perda óssea relacionada à idade está associada a uma diminuição da função dos osteoblastos (DEMPSTER e LINDSAY, 1993).

A ruptura trabecular e a perda mineral óssea relacionada à idade são provavelmente mediadas, pelo menos em parte, por fatores hormonais e nutricionais que interferem na regulação da homeostasia do cálcio, como o hormônio paratireóideo, calcitonina, deficiência de vitamina D e cálcio. Níveis de metabólitos de vitamina D no plasma diminuem com o envelhecimento e acredita-se que esta diminuição esteja relacionada a uma menor exposição aos raios do sol, redução na ingestão alimentar de vitamina D e na absorção desta

pelo intestino, e capacidade diminuída da pele de produzir esta vitamina em resposta a luz ultravioleta (BLUMSOHN e EASTELL, 1995). A deficiência da vitamina D resulta em uma diminuição na absorção de cálcio e conseqüentemente há um aumento nos níveis do hormônio paratireóideo que leva a uma reabsorção óssea (IQBAL, 2000).

A deficiência crônica de cálcio pode levar ao desenvolvimento da osteoporose, visto que o organismo direciona o metabolismo desse íon visando a manutenção de suas concentrações plasmáticas, muito mais do que para manter a integridade do esqueleto (NORDIN, 1997).

3.2.2 Tratamentos

A osteoporose precisa ser tratada para não adquirir proporções epidêmicas. Uma pequena diminuição da taxa de perda óssea pode levar a uma diminuição significativa no número de fraturas por osteoporose, além disso, a manutenção da massa óssea é mais fácil que a sua restauração. Assim, destaca-se a importância de tratamento preventivo da perda óssea (DEQUEKER, 1994; RIGGS e MELTON III, 1995).

Sabe-se que a densidade mineral óssea é o resultado do pico de massa óssea alcançado e a subseqüente perda óssea. Assim, uma das maneiras de prevenir a osteoporose é aumentando o pico de massa óssea durante o crescimento (SAMBROOK e LEONG, 1997), através de fatores como adequada nutrição, atividade física regular e evitar hábitos como o de fumar (KANIS e WHO, 1994). Outra forma de prevenção é evitar a perda óssea após a menopausa, e quando já instalada a osteoporose, deve-se prevenir a perda óssea adicional (SAMBROOK e LEONG, 1997).

Tanto na fase profilática como no tratamento da osteoporose já estabelecida, vários regimes medicamentosos podem ser usados e de modo geral podem ser divididos em duas categorias de acordo com o seu modo de ação: agentes estimulantes da osteogênese ou antiabsortivos, que inibem a reabsorção óssea.

O estrógeno é utilizado para tratamento da osteoporose e para prevenção da perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa ou com

função ovariana prejudicada (CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL, 2001). Uma preocupação proveniente da terapia de reposição hormonal é uma possível conexão desta com o risco de câncer de mama e endometrial (NOBEL SYMPOSIUM, 2000).

Entre as outras opções farmacológicas para o tratamento e/ou prevenção da osteoporose estão o alendronato, calcitonina, raloxifeno, fluoride, bifosfonatos, suplemento de cálcio e vitamina D (IQBAL, 2000). A maioria das medicações para a osteoporose estabelecida agem principalmente para prevenir a perda óssea adicional, sendo geralmente observado apenas um modesto aumento na densidade óssea (SAMBROOK e LEONG, 1997).

O tratamento para osteoporose em homens é pouco pesquisado, mas evidências sugerem que baixa dose de estrógeno, calcitonina, bifosfonatos e fluorides podem agir do mesmo modo que nas mulheres. No entanto, nenhuma medicação para osteoporose, que tem sido aprovada pelo órgão americano *Food and Drug Administration* para mulheres após a menopausa, foi aprovada para homens (IQBAL, 2000).

Intervenções mecânicas tem sido estudadas como tratamento potencial da perda de massa óssea. Como exemplo, podemos citar um recente estudo que ao analisar a influência de vibrações mecânicas, geradas por um vibrador acoplado a uma plataforma, de baixa intensidade e alta frequência sobre a estrutura óssea de ratas ovariectomizadas mostrou que é possível a obtenção de efeitos benéficos com a aplicação de cargas mecânicas na preservação da massa óssea (OXLUND et al., 2003).

Um outro tipo de intervenção mecânica que tem sido pesquisado e que também possui um potencial para o tratamento da perda de massa óssea é o ultra-som pulsado de baixa intensidade. Este recurso fornece energia mecânica na região estimulada e possui a vantagem de não ter efeitos colaterais muitas vezes presentes em tratamentos farmacológicos. A melhor exploração desta intervenção poderá culminar com o seu auxílio no combate da osteoporose no futuro.

3.2.3 A perda de massa óssea em ratas

Para o estudo de novos tratamentos, assim como para melhor compreensão das alterações causadas pela osteoporose ou osteopenia, freqüentemente são utilizados animais.

Um modelo animal de perda óssea precisa ter as características da redução da massa óssea e seqüelas semelhantes às dos humanos (KALU, 1991). Segundo Frost e Jee (1992), os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda da massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, assim como na osteoporose, são os mesmos em ratos e humanos. De maneira similar às mulheres após a menopausa, ratas ovariectomizadas apresentam uma alteração na formação e na reabsorção óssea, com um *turnover* (velocidade de remodelamento) aumentado resultando em perda óssea (THOMPSON et al., 1995).

A cirurgia de ovariectomia é o modelo mais popular para eventos associados com a osteoporose pós-menopausa, mas outros modelos de osteopenia experimental são usados como a indução por glicocorticóide, deficiência de vitaminas e cálcio, imobilização das patas do animal, orquiectomia e envelhecimento (MILLER, BOWMAN e JEE, 1995).

Segundo Kalu (1991), apesar de ratas de 12 meses apresentarem estabilidade no crescimento do esqueleto, essa idade é inconveniente devido o alto custo de ratas idosas, sua disponibilidade ser limitada e ao longo período necessário para que se manifestem os efeitos da ovariectomia sobre seus ossos. Em contraste, ratas de aproximadamente 3 meses de idade são facilmente disponíveis, não são muito caras, os efeitos da ovariectomia sobre o esqueleto do animal se manifestam em 1 mês ou menos após a cirurgia e as características da perda são similares ao modelo de rata idosa.

Li, Shen e Wronski (1997) analisaram as mudanças ósseas da região do colo femoral de ratas de 3 meses de idade após a cirurgia de ovariectomia. Utilizando a histomorfometria óssea quantitativa foi observado que a perda óssea trabecular nesse sítio foi estatisticamente significativa 30 dias após a ovariectomia, permanecendo relativamente moderada até os 3 meses após a cirurgia, tornando-se mais pronunciada posteriormente no decorrer do estudo, que analisou a perda óssea até 360 dias depois da cirurgia.

Após duas semanas de ovariectomia, Thompson et al. (1995) observaram que houve uma diminuição significativa do volume do osso trabecular da região proximal da tíbia de ratas devido à perda de trabéculas individuais e afinamento ósseo.

Dempster et al. (1995), no período de 40 dias após a ovariectomia em ratas de 6 meses de idade detectaram diminuição rápida do volume de osso trabecular na região proximal da tíbia e da densidade mineral óssea no osso trabecular distal do fêmur. A perda óssea trabecular foi o resultado da diminuição de placas trabeculares e reduções na conectividade.

Peng et al. (1994), utilizando 28 ratas de 3 meses de idade, observaram que 6 semanas após a ovariectomia houve diminuição significativa do volume ósseo trabecular quando comparado com o grupo controle submetido a simulação da ovariectomia.

Em relação às diferentes linhagens de animais, existem estudos utilizando ratas *Wistar* ovariectomizadas (HAIBO et al., 1998; KAASTAD et al., 2001; KUBO et al., 1999; MEKRALDI et al., 2003) e ratas *Sprague-Dawley* ovariectomizadas (DEMPSTER et al., 1995; LI, SHEN e WRONSKI, 1997; MOSEKILDE et al., 1998; WRONSKI et al., 1989) como modelos de osteopenia experimental.

3.2.4 A influência da perda óssea na avaliação biomecânica

Os ensaios mecânicos permitem determinar propriedades mecânicas de um material, podendo ser destrutivos ou não destrutivos. Na primeira categoria ocorre a ruptura ou a inutilização do material e alguns exemplos deste tipo de ensaio são os de compressão, flexão, tração, torção e fadiga. Os ensaios não destrutivos são realizados com o uso, por exemplo, de raios-X, ultra-som, entre outros (SOUZA, 1974).

Estudos sobre a perda de massa óssea muitas vezes utilizam em suas análises os ensaios mecânicos destrutivos.

A presença de uma relação entre densidade mineral óssea, medida pela tomografia computadorizada, e força mecânica foi descrita por Alho, Husby e Høiseth (1988) em um estudo com 36 cadáveres. A realização de ensaios

mecânicos em fêmures mostraram correlação muito significativa entre densidade mineral óssea trabecular das extremidades proximal e distal dos fêmures com o parâmetro força máxima.

Na osteoporose as propriedades mecânicas do osso podem ser afetadas e o osso irá se romper com cargas menores (EINHORN, 1992). Em diferentes modelos experimentais de perda óssea foram observadas alterações da resistência mecânica, com diminuição da carga de ruptura suportada pelo osso (PENG et al., 1994).

Assim, Peng et al. (1994), utilizando animais orquiectomizados, ovariectomizados e imobilizados, observaram por meio da histologia nas regiões distal do fêmur e proximal da tíbia que, após 4, 6 e 3 semanas respectivamente, todos os modelos levaram a diminuição do volume trabecular comparado com os controles correspondentes. O ensaio mecânico da região do colo femoral foi realizado, e para isto os fêmures foram cortados exatamente entre o meio e o terço distal do corpo. Os ossos foram então inseridos em furos existentes em uma placa do suporte de metilmetacrilato até o trocânter menor de cada fêmur entrar em contato com a placa. Para analisar a região do colo femoral a carga foi aplicada na cabeça do fêmur, paralela ao corpo do fêmur. Os resultados mostraram que houve diminuição significativa na absorção de energia e na carga máxima suportada pelo colo femoral nos diferentes modelos de osteopenia, sugerindo, desta forma, que a capacidade do colo femoral de resistir às cargas mecânicas fica comprometida (diminuída) na presença de uma massa óssea reduzida.

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

3.3 Ultra-som Pulsado de Baixa Intensidade

3.3.1 Características do ultra-som

O ultra-som é uma forma de energia mecânica transmitida transcutaneamente por ondas de pressão acústica de alta frequência em organismos biológicos. Ondas acústicas são simplesmente vibrações organizadas das moléculas ou átomos de um meio capaz de favorecer a sua propagação (CHRISTENSEN, 1988), podendo este ser um meio gasoso, líquido ou sólido (LOW e REED, 1994). A onda sonora é audível pelo aparelho auditivo humano quando possui frequência na faixa de 20 Hz a 20 kHz e ondas acima deste limite, não audíveis, são denominadas ultra-sônicas.

Primeiramente o homem utilizou este recurso para desenvolver equipamentos de emissão e detecção de ondas ultra-sônicas chamados de Sonar, utilizados em navios para mapear o fundo do oceano ou perceber corpos móveis com grande precisão (LUCENA, 1991).

O estudo do ultra-som se expandiu e atualmente sua aplicação pode ser feita para vários propósitos como em odontologia, industrialmente em processos de purificação e mistura e no campo da biologia.

Na área biológica, o ultra-som foi introduzido há aproximadamente 70 anos, é amplamente utilizado e ainda existem inúmeras pesquisas sendo realizadas a fim de explorar mais o seu campo de atuação e também para melhor compreensão de seus efeitos e de sua interação com o meio biológico.

Na medicina o ultra-som é usado como recurso cirúrgico, sendo necessário para isso intensidades muito elevadas de 5 a 300 W/cm² (WELGUS, JEFFREY e EISEN, 1981), e como meio diagnóstico para, por exemplo, verificar o desenvolvimento fetal e fornecer imagens de órgãos vitais (KAUFMAN e EINHORN, 1993). Ao contrário das intensidades cirúrgicas, para diagnóstico são utilizadas intensidades baixas de 1 a 50 mW/cm².

Considerado um instrumento indispensável por muitos fisioterapeutas, o ultra-som é comumente empregado nessa área para auxiliar o tratamento de disfunções dos tecidos moles, incluindo contraturas articulares, tendinites, bursites, espasmos músculo-esqueléticos e dor (LEWIN e ZISKIN, 1993).

O equipamento de ultra-som terapêutico consiste em um gerador que produz corrente elétrica alternada de alta frequência, que a seguir é convertida por um transdutor em vibrações mecânicas ou acústicas. O transdutor é composto basicamente por um cristal introduzido entre dois eletrodos, que faz a conversão da voltagem alternada de alta frequência em vibrações mecânicas pela inversão do efeito piezoelétrico (LEHMANN e LATEUR, 1984).

Muitos tipos de cristais podem ser usados no transdutor, mas os mais propícios são o quartzo, o qual é encontrado naturalmente, e alguns materiais cerâmicos sintéticos como o titanato de bário e o titanato zirconato de chumbo (PZT) (LOW e REED, 1994).

Com relação aos mecanismos físicos pelos quais o ultra-som terapêutico induz respostas clinicamente significativas em tecidos biológicos, podem ser classificados como térmicos e não térmicos, ou mecânicos (DYSON, 1987; YOUNG, 1996). Conforme o tipo de onda utilizado pode ocorrer a potencialização de um ou do outro efeito. Desta forma, o ultra-som contínuo caracteriza-se pela forte produção de calor, que também está presente no pulsado, porém de forma reduzida, devido às interrupções regulares na propagação da onda (PATRICK, 1978).

Um outro ultra-som empregado clinicamente e de interesse nesse estudo é o ultra-som pulsado de baixa intensidade. Essencialmente não há grande diferença no circuito gerador do equipamento de ultra-som pulsado de baixa intensidade e do ultra-som terapêutico, porém há diferenças na forma de ondas geradas, nos parâmetros utilizados.

A comparação do ultra-som pulsado de baixa intensidade e o ultra-som terapêutico mostra que a largura de pulso (200 μ s) do primeiro é 10 vezes menor que a largura de pulso encontrado em muitos equipamentos de ultra-som terapêutico (2 ms).

A frequência fundamental do ultra-som de baixa intensidade comumente utilizada é de 1,5 MHz, estando dentro do intervalo de frequência utilizado no ultra-som terapêutico, que varia de 1 a 3 MHz. A atenuação aumenta com as frequências maiores, assim a energia transmitida com 3 MHz é absorvida nos tecidos superficiais enquanto a energia transmitida com frequências menores penetra mais profundamente nos tecidos (LOW e REED, 1994)

Há grandes variações na potência e na intensidade entre o ultra-som pulsado de baixa intensidade e o ultra-som terapêutico. Este último gera potência acústica de 1 a 25 W e intensidade de 0,1 a 3 W/cm² (NYBORG e WU, 1993), capaz de gerar efeito térmico. O ultra-som pulsado de baixa intensidade gera potência em torno de 150 mW e intensidade em torno de 30 mW/cm², estando esta dentro do intervalo de procedimentos diagnósticos, considerado não térmico e não destrutivo. Sabe-se que a quantidade de energia que é convertida em calor é proporcional à intensidade do ultra-som (LOW e REED, 1994), assim intensidades baixas, menores que 100 mW/cm² não causam efeito térmico (DINNO et al., 1989).

Duarte (1983) analisou a temperatura de ossos osteotomizados de coelhos durante a estimulação com ultra-som pulsado de baixa intensidade e encontrou um insignificante aumento de temperatura menor que 0,01°C, constatando que o efeito da estimulação é de origem não térmica. Nas análises histológicas não houve evidências de neoformação óssea anormal.

Assim, a atuação não térmica e sim por mecanismo mecânico e o fornecimento de ondas com alta frequência e uma intensidade baixa, caracterizam o ultra-som pulsado de baixa intensidade. Adicionalmente, a ausência de efeito térmico e cavitação permite uma estimulação prolongada direcionada a um local específico.

Este importante recurso é utilizado para acelerar a consolidação de fraturas recentes e para o tratamento de pseudoartroses estabelecidas (RUBIN et al., 2001). Ele fornece uma força mecânica no sistema celular (HADJIARGYROU et al., 1998; KRISTIANSEN et al., 1997), capaz de gerar estímulos osteogênicos, através de respostas celulares (NARUSE et al., 2000).

Assim, com a estimulação ultra-sônica, as cargas necessárias ao reparo ósseo são produzidas no osso por meio do efeito piezoelétrico, pois o ultra-som pulsado atinge o osso por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso, e o metabolismo ósseo é estimulado bioeletricamente (XAVIER e DUARTE, 1983).

3.3.2 Aplicações clínicas e em animais do ultra-som pulsado de baixa intensidade

Os parâmetros do ultra-som pulsado de baixa intensidade foram primeiramente estabelecidos por Duarte (1977, 1983). Muitas pesquisas foram realizadas posteriormente e os parâmetros de 200 μ s de largura de pulso, freqüência de pulsos de 1,0 kHz, freqüência fundamental de 1,5 MHz e intensidade de 30 mW/cm² mostraram influenciar osteoblastos *in vitro* (ITO et al., 2000; KOKUBO et al., 1999), acelerar a reparação de fraturas em animais (PILLA et al., 1990; WANG et al., 1994), em humanos (COOK et al., 1997; HECKMAN et al., 1994; KRISTIANSEN et al., 1997) e em casos de pseudoartrose (MAYER, FRANKEL e RÜTER, 2000). Na tentativa de otimização dos parâmetros foram realizados alguns estudos, que analisaram o comprimento de onda, a freqüência fundamental e de pulso (WANG et al., 1994; JINGUSHI et al., 1998 *apud* RUBIN et al., 2001).

Wang et al. (1994), utilizando diferentes freqüências, analisaram a influência do ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas fechadas bilaterais do eixo femoral de ratos *Long Evans* machos, estabilizadas com um fio de *Kirschner*. O reparo da fratura foi avaliado no 21 dia pós-operatório por radiografia, histologia e ensaio mecânico de torção. O efeito estimulador do ultra-som no reparo de fraturas não foi inibido pela presença de um dispositivo interno metálico de fixação. Freqüências de 1,5 MHz ou 0,5 MHz durante 200 μ s repetidas com uma freqüência de 1,0 kHz e com intensidade de 30 mW/cm² aceleraram com segurança o reparo de fraturas dentro de 21 dias em um modelo com fixação metálica, mas o processo de restauração foi melhor com a freqüência de 1,5 MHz.

Jingushi et al. (1998 *apud* Rubin et al., 2001) encontraram que pulsos com 200 μ s foram mais efetivos para o tratamento de fraturas que 100 ou 400 μ s e a freqüência de pulsos de 1,0 kHz foi melhor que a de 2,0 kHz.

O pioneiro no estudo do ultra-som pulsado de baixa intensidade como estimulador osteogênico foi Duarte (1977), que baseado nas propriedades elétricas do tecido ósseo (piezoelectricidade) investigou o uso desse ultra-som na consolidação de fraturas ósseas em coelhos. Realizou um defeito bilateral na forma de furo em uma das corticais do fêmur e fez uma osteotomia bilateral

da fíbula, estabelecendo, para cada tipo de fratura, um grupo de animais controle e um grupo de animais tratado por ultra-som pulsado de baixa intensidade. Através da área do calo formado e das análises histológicas e radiográficas concluiu que o ultra-som acelerou a formação do calo ósseo e obteve em seu experimento ganho de tempo na consolidação de fraturas de coelhos, sob estímulo do ultra-som, na ordem de 50%.

Xavier e Duarte (1983) realizaram a primeira investigação clínica sobre os efeitos do ultra-som com intensidade de 30 mW/cm² em pacientes portadores de pseudoartrose. No período de 1979 a 1982, 27 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP foram submetidos a esse tratamento, e na maioria dos casos as aplicações foram realizadas diariamente por 20 minutos. O índice de sucesso foi de 70% e o tempo de estimulação variou de 45 a 120 dias.

O estudo de Heckman et al. (1994), randomizado, duplo-cego, avaliou o efeito do ultra-som na cura de fraturas corticais, sendo examinadas 67 fraturas de tíbia aberta tipo-I ou fechada. Os critérios clínico e radiográfico mostraram uma diminuição de 154 para 96 dias (38%) no tempo de cura de fraturas do grupo tratado com ultra-som ativo comparando-se com o grupo não tratado (placebo).

Kristiansen et al. (1997) também realizaram um grande estudo randomizado, duplo-cego, para testar a eficácia do ultra-som pulsado de baixa intensidade na redução do tempo de cura de fraturas distais do rádio de 60 pacientes. No grupo placebo demorou em média 98 dias para ocorrer a consolidação da fratura enquanto o grupo tratado com ultra-som ativo necessitou de apenas 61 dias em média, ou seja, uma diminuição de 38% no tempo de cura como encontrado no estudo de Heckman et al. (1994). Além do benefício na aceleração da cura das fraturas, ocorreu uma diminuição na perda de redução da fratura durante a sua consolidação no grupo estimulado com ultra-som ativo.

Cook et al. (1997) verificaram que o ultra-som pulsado de baixa intensidade foi eficaz para acelerar a consolidação de fraturas, do osso cortical e do osso trabecular, mesmo em fumantes. O tempo de consolidação de fraturas de tíbia foi 36% maior em pacientes fumantes comparado com pacientes não fumantes, mostrando que o hábito de fumar influi negativamente

o processo de consolidação de fraturas. Reduções significativas no tempo de consolidação de fraturas da tíbia e distal do rádio foram observadas, para fumantes e não fumantes, no grupo tratado com ultra-som ativo comparado com o placebo. O tempo de consolidação da fratura tibial foi reduzido em 41% em fumantes e 26% em não fumantes com a aplicação do ultra-som ativo, e a redução do tempo de consolidação na fratura distal do rádio foi de 51% em fumantes e 34% em não fumantes.

Além dos benefícios na recuperação de fraturas em pacientes fumantes, o ultra-som pulsado de baixa intensidade aumenta a possibilidade de consolidação de fraturas em pacientes que possuem doenças ou que utilizam medicamentos que a comprometem. Assim, a taxa de sucesso na cura de fraturas é de 92% em pacientes diabéticos, 95% em osteoporóticos, 92% em alcoólatras e em dependentes de drogas, 86% em insuficiência vascular, 91% em uso de esteróides, 89% com drogas antiinflamatórias não esteróides e 90% com bloqueadores de canais de cálcio (HADJIARGYROU et al., 1998).

Mayer, Frankel e Rüter (2000) mostraram que em pacientes com pseudoartrose e retardo de consolidação óssea que possuem doenças que afetam o metabolismo ósseo, o tratamento com ultra-som promove taxa de consolidação baixa em doenças renais (76%) e insuficiência vascular (70%) quando comparados com as taxas de consolidação satisfatórias em diabetes (87%), em infecções locais (100%) e em osteoporose (87%).

Estudos *in vitro* demonstraram que o ultra-som pulsado de baixa intensidade aumentou a incorporação de cálcio em culturas de células ósseas e cartilagens e modulou a atividade de adenilato ciclase e a síntese de fator beta transformador do crescimento (TGF- β) em células osteoblásticas (RYABY et al., 1989 *apud* RUBIN et al., 2001; RYABY, MATHEW e DUARTE-ALVES, 1992 *apud* RUBIN et al., 2001).

Kokubo et al. (1999) aplicaram ultra-som de 30mW/cm², por 20 minutos, em osteoblastos de camundongos a fim de verificar a sua influência na prostaglandina E2 (PGE2), considerada um regulador importante da formação óssea. A exposição ao ultra-som aumentou a produção da PGE2 e estimulou a expressão de mRNA ciclooxigenase-2, uma enzima relacionada à produção da PGE2.

Os efeitos de 20 minutos de estimulação ultra-sônica de baixa intensidade, com frequência fundamental de 1,5 MHz, frequência de pulso de 1,0 kHz, foram investigados em células ST2, originadas do estroma da medula óssea, em um estudo realizado por Naruse et al. (2000). Essas células responderam ao ultra-som com níveis elevados de mRNAs de fator de crescimento insulina (IGF), osteocalcina, sialoproteína óssea e também elevou a expressão transitória de mensageiro de ciclooxigenase-2. Os resultados forneceram indícios de que o ultra-som induz uma reação anabólica de células osteogênicas, levando a formação da matriz óssea.

Ito et al. (2000) mostraram que o ultra-som de baixa intensidade e a 1,25 dihidroxivitamina D₃ estimularam a secreção de fatores de crescimento em culturas de osteoblastos humanos e em células endoteliais.

Diante da comprovação da eficácia do ultra-som pulsado de baixa intensidade para acelerar o processo de consolidação de fraturas e para o tratamento de pseudoartrose, e associado a isto, o fato do ultra-som funcionar como um tipo de estímulo mecânico osteogênico, outras pesquisas foram conduzidas a fim de verificar outras aplicações potenciais deste recurso.

Assim, além de casos de pseudoartroses e fraturas, a estimulação óssea com ultra-som foi realizada em artrodeses de coluna (GAMA, 2002; GLAZER et al., 1998), em ossos de ratos em crescimento (SPADARO e ALBANESE, 1998), em alongamento ósseo (SHIMAZAKI et al., 2000), e na osteoporose ou osteopenia (ARAI et al., 1993; CARVALHO, 2001; WARDEN et al., 2001a; WARDEN et al., 2001b).

Em casos de artrodeses, o ultra-som induziu o aumento da taxa de fusão espinhal de coelhos, melhorou as propriedades mecânicas da região da fusão e aumentou a formação óssea (GLAZER et al., 1998). Resultados positivos também foram observados em fusão das vértebras atlas e áxis de cães estimulada com ultra-som pulsado de baixa intensidade (GAMA, 2002).

O alongamento ósseo da tíbia de coelhos, realizado com fixador externo unilateral, também foi beneficiado com a estimulação com ultra-som pulsado de baixa intensidade. A área do calo duro, como mostrado pela radiografia, a densidade mineral óssea e a análise do ensaio de torção foram significativamente maiores no grupo tratado com ultra-som comparado com o grupo controle não submetido a esta estimulação. Utilizando uma distração

rápida, observaram que o ultra-som acelerou a maturação óssea. (SHIMAZAKI et al., 2000).

Spadaro e Albanese (1998) estudaram os efeitos do ultra-som de baixa intensidade em ossos longos de ratos em crescimento, durante 4 semanas, com aplicação diária de 20 minutos. Os resultados mostraram que o ultra-som não interferiu no crescimento da tíbia e do fêmur, como também não proporcionou aumento da densidade mineral óssea. O estudo também verificou que a diáfise femoral de ossos em crescimento na presença de um trauma periosteal não foi influenciada pelo ultra-som.

Os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na osteoporose foram estudados por Warden et al. (2001b), que utilizaram as regiões distal do fêmur e proximal da tíbia de ratas ovariectomizadas para serem submetidas ao tratamento com ultra-som. Os parâmetros utilizados foram 30 mW/cm² de intensidade, 200 µs de largura de pulso, frequência fundamental de 1,0 MHz, frequência de pulsos de 1,0 kHz e a aplicação foi realizada pelo método subaquático. Durante 12 semanas os animais foram expostos diariamente ao ultra-som ativo de um lado e ao ultra-som inativo no membro contralateral. As análises por densitometria de dupla energia de raios-x (DXA) e histomorfometria mostraram que a ovariectomia resultou em mudanças ósseas significativas, mas o ultra-som não influenciou essas mudanças.

Um estudo clínico realizado por Warden et al. (2001a) analisaram os efeitos do ultra-som de baixa intensidade na prevenção de osteoporose seguinte a lesão do nervo espinhal em 15 pacientes. Foi utilizado 30 mW/cm², ondas pulsadas de 10 µs com frequência de 1,0 MHz e frequência de pulsos de 3,3 kHz. A região estimulada foi o calcâneo, sendo aplicado ultra-som ativo em um membro e o inativo no membro contralateral, e a duração do tratamento foi de 6 semanas, realizado 5 dias por semana, por 20 minutos diários. O ultra-som quantitativo e a densitometria de dupla energia de raios-x mostraram que não houve diferenças entre o calcâneo estimulado ativamente e o placebo.

Ao contrário desses resultados obtidos nos estudos do ultra-som na perda óssea, Arai et al. (1993) mostraram que o ultra-som preveniu e melhorou a densidade mineral óssea. O tratamento foi realizado durante 4 semanas, com duração de 20 minutos diários e o equipamento forneceu largura de pulso de 200 µs, frequência fundamental de 1,0 MHz, com pulsos repetindo a 1,0 kHz e

intensidade de 30 mW/cm². A estimulação foi realizada em 5 pacientes com 71,6 anos de idade em média, osteoporóticos, com fraturas por compressão das vértebras lombares imobilizadas por colete, e tiveram suas atividades limitadas. A região tratada com ultra-som foi o colo femoral de um membro e o contralateral foi utilizado como controle. Houve aumento médio de 8,9% na densidade mineral óssea do colo femoral estimulado, enquanto o lado não estimulado teve diminuição de 4% na densidade mineral óssea. Observou-se que a densidade mineral óssea da região estimulada aumentou em todos os casos, com exceção de um paciente que apresentou diminuição mínima da densidade mineral óssea do colo femoral estimulado enquanto o lado contralateral não estimulado teve diminuição mais acentuada.

Carvalho (2001) estudou os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade em ratas osteopênicas. Os parâmetros do ultra-som foram 30 mW/cm² de intensidade, frequência fundamental de 1,5MHz durante 200 µs, frequência de pulso de 1,0 kHz e a aplicação iniciou no 31 dia após a cirurgia de ovariectomia, com duração de 20 minutos diários por 20 dias consecutivos. Utilizando o ensaio de flexão em 3 pontos foi observado que as propriedades mecânicas da diáfise femoral não se alteraram nos ossos osteopênicos comparados com os ossos normais, assim como também não se alteraram nos ossos tratados comparados com os não tratados. Provavelmente esta análise não foi alterada com a ovariectomia e com o ultra-som devido à região óssea testada ser constituída por osso cortical. A perda óssea cortical seguinte à ovariectomia é mínima (KALU, 1991) porque o crescimento periosteal compensa o aumento da reabsorção endosteal (TURNER, VANDERSTEENHOVEN e BELL, 1987). No entanto resultados positivos foram encontrados nas análises dos achados histológicos da região proximal dos fêmures. Houve diferenças estruturais entre o grupo tratado e o placebo, com maior preservação de trabéculas e indícios de neoformação óssea no grupo tratado.

De modo geral, é importante destacar que estudos clínicos observaram que pacientes submetidos ao tratamento com este ultra-som não apresentaram reação anômala sistêmica ou local, assim como também não foram evidenciados efeitos colaterais prejudiciais à saúde (ARAI, et al., 1993; KRISTIANSEN et al., 1997; WARDEN et al., 2001a; XAVIER e DUARTE,

1983). A única reação adversa encontrada foi a presença de câimbra muscular por uma semana relatada por um dos sessenta e seis pacientes do estudo de Heckman et al. (1994).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Os animais do experimento

Foram utilizadas 28 ratas da raça *Wistar*, com peso corporal médio de 251,4 gramas, provenientes do Biotério Central Universidade de São Paulo (USP) Campus de Ribeirão Preto. A idade dos animais foi baseada em uma curva de crescimento, que relaciona peso corporal e idade para ratas *Wistar*, do Laboratório de Bioengenharia da USP Campus de Ribeirão Preto, visto que a idade dos animais não era conhecida. No início do experimento, a média do peso corporal dos animais correspondeu à idade de aproximadamente 3 meses.

Os animais foram acondicionados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da USP Campus de São Carlos, mantidos em gaiolas e alimentados sem restrições com ração padrão e água. Para identificação dos animais, as patas foram marcadas com solução saturada de ácido pícrico.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos:

- 9 ratas intactas que não sofreram nenhum tipo de intervenção (grupo intacto);
- 9 ratas ovariectomizadas controles, que não foram submetidas ao tratamento (grupo ovariectomizado);
- 10 ratas ovariectomizadas e tratadas com ultra-som (grupo tratado).

A eleição do grupo intacto foi realizada com a finalidade de detectar os valores do limite máximo em condições normais, o grupo ovariectomizado foi fundamental para verificar alterações nesses valores com a instalação da

osteopenia e também para servir como controle (do grupo tratado), e o grupo tratado para verificar se o ultra-som influi nos valores deste parâmetro mecânico.

Após 9 semanas em relação ao início do experimento, os animais de todos os grupos foram eutanasiados com inalação excessiva de éter.

4.3 O osso escolhido

O osso eleito para a aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade foi o fêmur, mais especificamente a sua extremidade proximal (Figura 6), pela presença de osso trabecular.

Em todos os grupos foram avaliados os fêmures direito e esquerdo do animal.

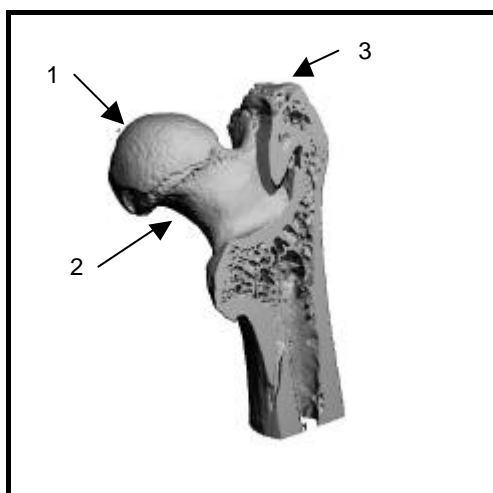


Figura 6- Extremidade proximal do fêmur de rato: 1) cabeça femoral, 2) colo femoral, 3) trocanter maior.

Fonte- Disponível em: <http://www.scanco.ch/images/uct_rat_fêmur.jpeg>. Acesso em: 20 jul. 2003.

4.4 Procedimento cirúrgico

Para indução da perda óssea foi realizada a cirurgia de ovariectomia bilateralmente. As ratas foram anestesiadas durante todo o procedimento cirúrgico utilizando-se o éter. O acesso ao ovário foi feito por meio de uma incisão lateral. Com uma tesoura foi cortada a pele do animal e em seguida foi

realizado o divulsionamento do tecido subcutâneo e do tecido muscular, permitindo assim a exposição do ovário para sua retirada (Figura 7).

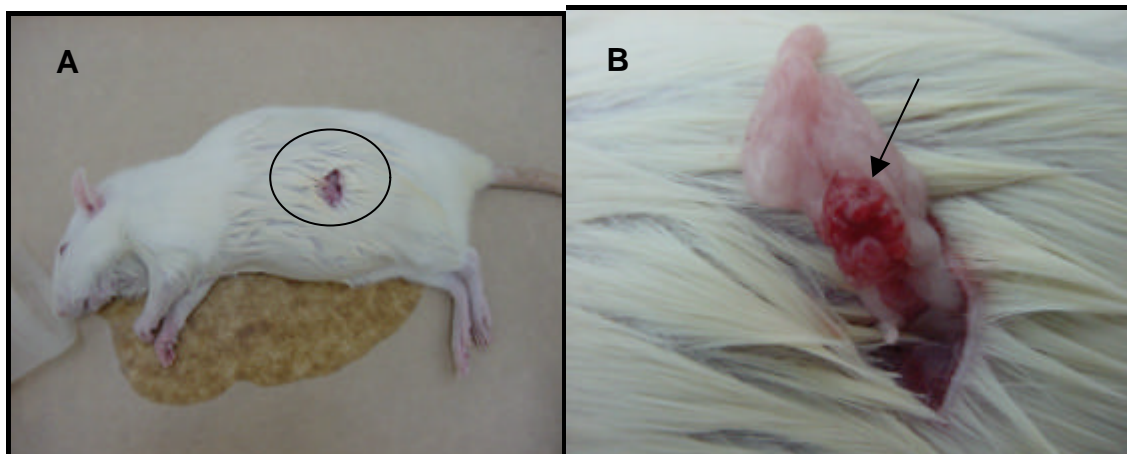


Figura 7- A) Local da incisão para acesso ao ovário, B) Exposição do ovário para sua posterior retirada.

Após a exposição do ovário, um fio de algodão foi amarrado separando o ovário das demais estruturas e em seguida foi feita a ovariectomia utilizando-se uma tesoura (Figura 8). A sutura da porção muscular foi realizada utilizando o fio reabsorvível Categute e a sutura externa foi feita com fio de nylon não reabsorvível. O local da incisão foi limpo com álcool e depois foi utilizado o polvidine. O mesmo procedimento cirúrgico foi realizado no outro lado do animal, para a retirada bilateral do ovário.



Figura 8- Retirada do ovário.

4.5 Ultra-som

O aparelho de ultra-som pulsado de baixa intensidade, fornecido pela Bioengenharia da USP Campus de São Carlos, possui transdutor de cerâmica PZT (titanato zirconato de chumbo) com área de 3,88 cm², e tem as seguintes características: frequência fundamental de 1,5 MHz, largura de pulso de 200 μ s, frequência de pulsos 1,0 kHz e ciclo de trabalho de 20%. A potência foi de 150 mW e a intensidade de 38,7 mW/cm². O equipamento do ultra-som está mostrado na Figura 9 e suas características estão esquematizadas na Figura 10.

O equipamento foi devidamente calibrado antes de sua utilização e no decorrer do experimento, pelo menos uma vez ao mês. Em todas as calibrações os parâmetros do ultra-som não estavam alterados e o equipamento encontrava-se em perfeitas condições de uso.

Um gel de acoplamento foi utilizado na superfície do transdutor para facilitar a transmissão das ondas ultra-sônicas à pele do animal.

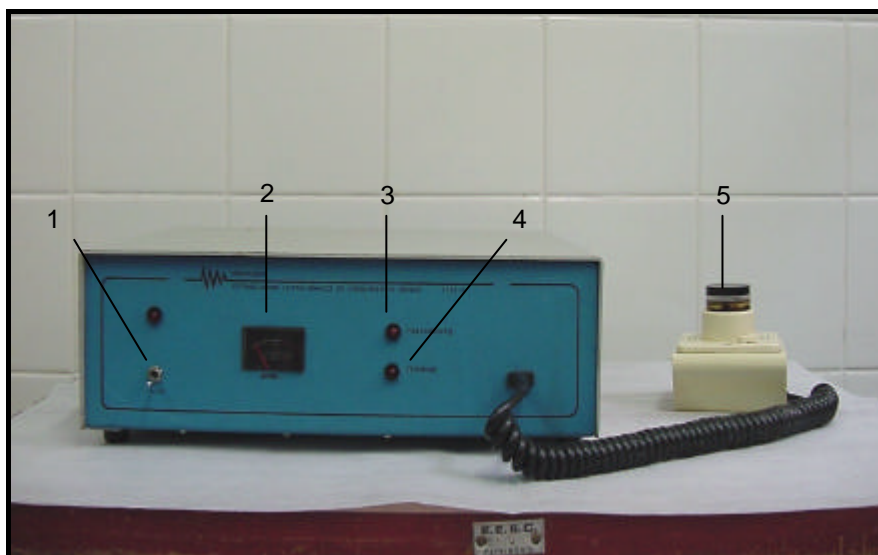


Figura 9 Equipamento de ultra-som de baixa intensidade utilizado para o tratamento: 1) chave geral liga/desliga; 2) mostrador analógico indicativo de potência; 3) *led* que indica que o aparelho está atuando no modo pulsado; 4) *led* indicador do término do tratamento; 5) transdutor de PZT e adaptador para encaixar na mesa de tratamento.

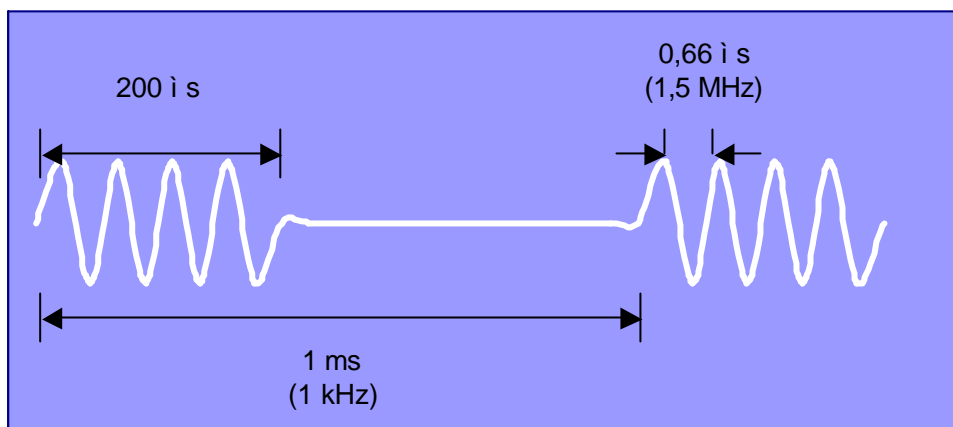


Figura 10- Características do ultra-som.

A aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade no grupo tratado foi iniciada no 1 dia após a cirurgia de ovariectomia, ou seja, antes da instalação da osteopenia, e foi realizada durante 9 semanas consecutivas, 6 dias por semana, com duração de 20 minutos diários.

A estimulação foi feita simultaneamente nas extremidades proximais dos fêmures do animal. Os animais foram mantidos sobre uma mesa, na qual foi fixado o cabeçote do ultra-som, e durante a aplicação as patas traseiras foram presas com material elástico e auxílio manual para uma efetiva aplicação (Figura 11). O cabeçote do ultra-som com mobilidade aproximada de 15mm na direção vertical foi suficiente para acompanhar os movimentos do animal durante a aplicação.



Figura 11- Animais colocados na mesa para aplicação do ultra-som, com o cabeçote sob as extremidades proximais dos fêmures de ambas as patas.

4.6 Inclusão do osso na resina

Após a eutanásia, foram retirados os músculos e outros tecidos moles ao redor para obtenção do fêmur isolado. Foram medidos o comprimento do osso com o paquímetro e o peso do osso com uma balança digital Mettler AT 261 DeltaRange® com precisão de 0,0001 g.

Para o ensaio mecânico as metades distais dos fêmures foram incluídas em resina acrílica de uso odontológico (Figura 12A) e para evitar que o aquecimento excessivo durante o processo de polimerização provocasse alterações nas propriedades ósseas, foi utilizado soro fisiológico à baixa temperatura para imersão da resina. A inclusão do osso na resina foi realizada com um suporte de latão que auxiliou no alinhamento dos fêmures. Foi utilizado um molde de alumínio dividido em duas partes e estas foram unidas entre si por elástico formando um vazio com base quadrada para o enchimento com resina (Figura 12B). As peças do molde foram, anteriormente à deposição da resina, lubrificadas com óleo para facilitar depois a sua retirada.

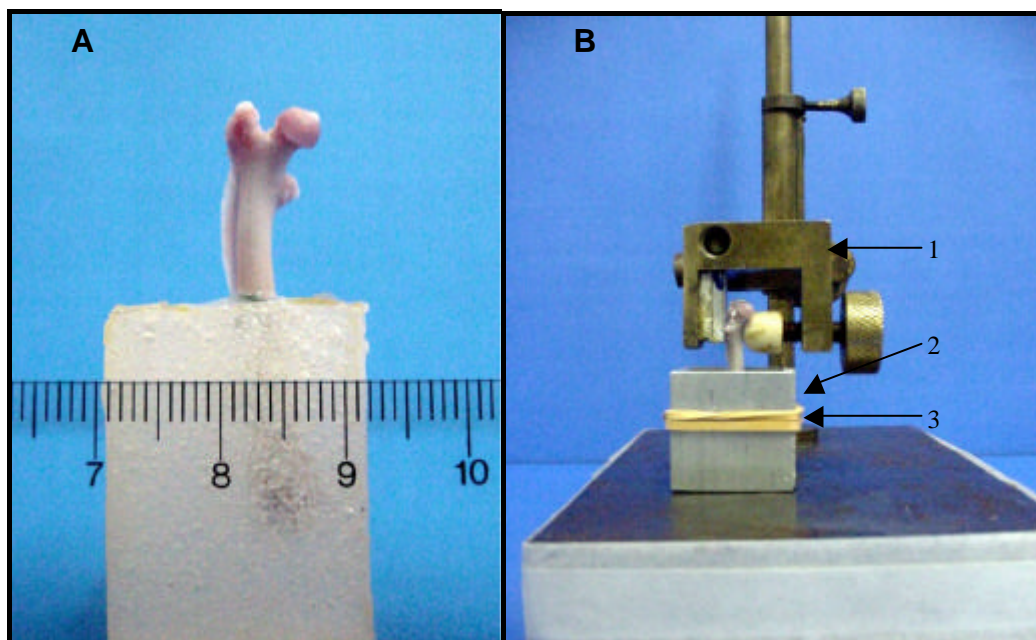


Figura 12- A) Fêmur (metade distal) incluído na resina acrílica para a realização do ensaio de flexo-compressão, B) 1-Suporte de latão utilizado para inclusão do osso na resina acrílica; 2 molde de alumínio; 3- elástico.

Durante todo o procedimento de inclusão na resina, os ossos foram mantidos umedecidos com soro fisiológico. Após o endurecimento da resina, os

modelos de prova foram identificados e para melhor preservação de suas propriedades mecânicas em comparação às propriedades *in vivo*, os fêmures foram envoltos em gaze, embebidos em soro fisiológico e congelados, até a realização dos ensaios mecânicos.

Os ossos congelados, já incluídos na resina, foram retirados do *freezer* 12 horas antes dos ensaios, mantidos num refrigerador e algumas horas antes do ensaio, foram colocados em temperatura ambiente ainda envolvidos com gases umedecidas em soro fisiológico.

4.7 Métodos de avaliação

4.7.1 Peso corporal

Foram medidos os pesos corporais das ratas no início do experimento e no dia da eutanásia dos animais, ou seja, 9 semanas após o ato cirúrgico nos grupos ovariectomizados (controle e o tratado) e durante o mesmo período de tempo para os animais do grupo intacto. Para isto, foi utilizado a balança analógica Filizola[®] com precisão de ± 5 gramas.

Para verificar se não houve variação significativa no peso corporal entre os grupos no início do experimento, foram colhidos os pesos iniciais dos animais. A aferição dos pesos finais foi realizada com a finalidade de observar possíveis variações nos pesos corpóreos do grupo ovariectomizado e do grupo tratado em relação ao grupo controle.

4.7.2 Ensaio de flexo-compressão

Para determinar a resistência da extremidade proximal dos fêmures nos diferentes grupos experimentais foram realizados ensaios de flexo-compressão na Máquina Universal da Bioengenharia da USP Campus de Ribeirão Preto. A célula de carga tinha capacidade de 50 kgf e se ligava a uma ponte de extensometria. As deformações foram fornecidas por um relógio comparador MITUTOYO[®], com precisão de 0,01 mm.

A carga foi aplicada na cabeça femoral na direção vertical. Foi utilizado um acessório de aplicação com formato côncavo, na região que fica em contato com o osso, para melhor distribuição da carga aplicada (Figura 13). Em todos os ensaios foi aplicada uma pré-carga de 3,92 N durante 30 segundos para acomodação do sistema. A velocidade utilizada foi de 0,25 mm/min.

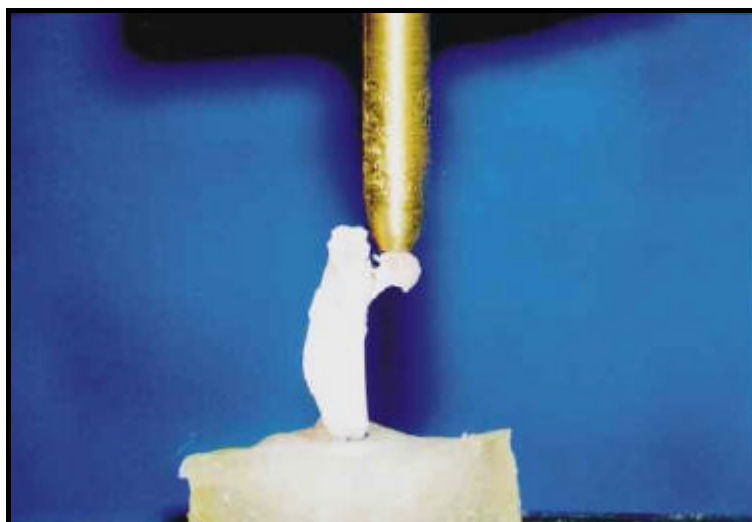


Figura 13- Ensaio mecânico de flexo-compressão, com aplicação da carga na cabeça femoral. Acessório de aplicação côncavo para melhor distribuição da carga aplicada.

A partir dos valores de carga e deformação obtidos nos ensaios foram construídas curvas carga versus deformação e o parâmetro limite máximo (LM) foi avaliado (Figura 14).

Para verificar se os parâmetros mecânicos de um membro e os parâmetros do contralateral foram similares foi realizada a comparação do LM entre os fêmures direito e esquerdo dos animais.

Limite máximo

O LM é utilizado como critério de avaliação da resistência e é o maior valor da carga com a deformação correspondente, observado em cada ensaio.

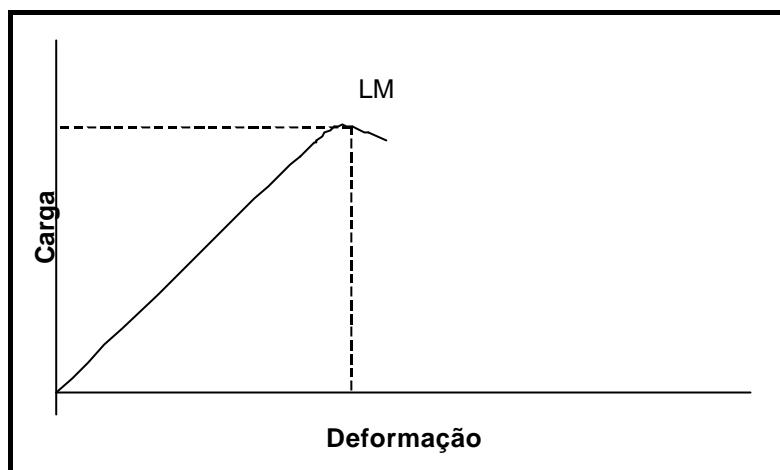


Figura 14- Exemplo de gráfico carga versus deformação, ilustrando o limite máximo (LM) com a sua carga e deformação correspondente.

4.8 Análise estatística

Para avaliar os pesos corporais iniciais e finais dos animais, os pesos e comprimentos dos fêmures e para análise dos dados obtidos no ensaio de flexo-compressão foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) para a comparação simultânea entre todos os grupos (intacto, ovariectomizado e tratado). O *post-hoc* utilizado para a comparação entre pares de grupo foi o *Student-Newman-Keuls*. Quando a ANOVA detectou diferença significativa entre os grupos, realizou-se a análise de *Student-Newman-Keuls* a fim de localizar em quais pares de grupos (intacto x ovariectomizado, intacto x tratado, ovariectomizado x tratado) houve esta diferença significativa. Para estas análises foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Instat*[®].

A comparação do limite máximo entre os fêmures direito e esquerdo dos animais foi realizada através do teste T de *Student* utilizando-se o programa *Minitab*[®].

O nível de significância foi de 5% em todas as comparações.

5 RESULTADOS

Inicialmente o experimento foi composto por 36 animais, sendo o intuito colocar 10 animais em cada um dos três grupos experimentais e deixar 6 animais extras para substituir algumas perdas no decorrer do experimento. Alguns animais morreram durante o procedimento cirúrgico provavelmente por inalação excessiva de éter e um animal morreu durante a aplicação do ultrassom. Neste caso, foi na realização do primeiro tratamento com ultrassom, o animal foi fixado na mesa com uma *thera-band* ao redor do corpo e na tentativa de imobilizá-lo ele morreu. Todos os outros animais do grupo tratado foram então imobilizados com auxílio manual e as patas traseiras foram presas com material elástico. Devido a estas intercorrências foram utilizados no experimento 28 animais.

Dos 56 fêmures obtidos dos 28 animais utilizados no experimento, 2 fêmures de animais distintos do grupo tratado foram excluídos, um deles por avulsão da cabeça femoral e o outro por lesão óssea na extremidade proximal durante o procedimento de desarticulação e dissecação dos ossos. O ensaio de flexo-compressão foi realizado em 54 ossos. Para obtenção dos resultados finais foram desprezados 7 fêmures (2 do grupo intacto, 3 do grupo ovariectomizado e 2 do grupo tratado) por erros de manipulação da amostra.

As fraturas decorrentes do ensaio de flexo-compressão estavam localizadas na região do colo femoral, havendo associação da fratura do colo com fratura da cabeça do fêmur em 12 ossos (6 do grupo intacto, 3 do grupo ovariectomizado e 3 do grupo tratado).

Os resultados obtidos das análises dos pesos inicial e final dos animais, dos pesos e comprimentos dos fêmures, assim como as curvas carga versus deformação e a avaliação dos parâmetros mecânicos carga e deformação do limite máximo estão apresentados a seguir.

5.1 Peso dos animais

Os valores médios e os desvios padrão do peso corporal dos animais nos diferentes grupos, no início do experimento e no dia da eutanásia, estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 15 e 16.

Tabela 1- Médias e desvios padrão do peso corporal inicial e final dos animais de cada grupo.

Grupos	Períodos	Peso corporal (g)
Intacto	Inicial	252,2±17,9
	Após 9 semanas	328,9±39,2
Ovarectomizado	Inicial	250,0±17,3
	Após 9 semanas	357,8±46,9
Ovarectomizado e tratado	Inicial	252,0±16,9
	Após 9 semanas	300,0±39,7

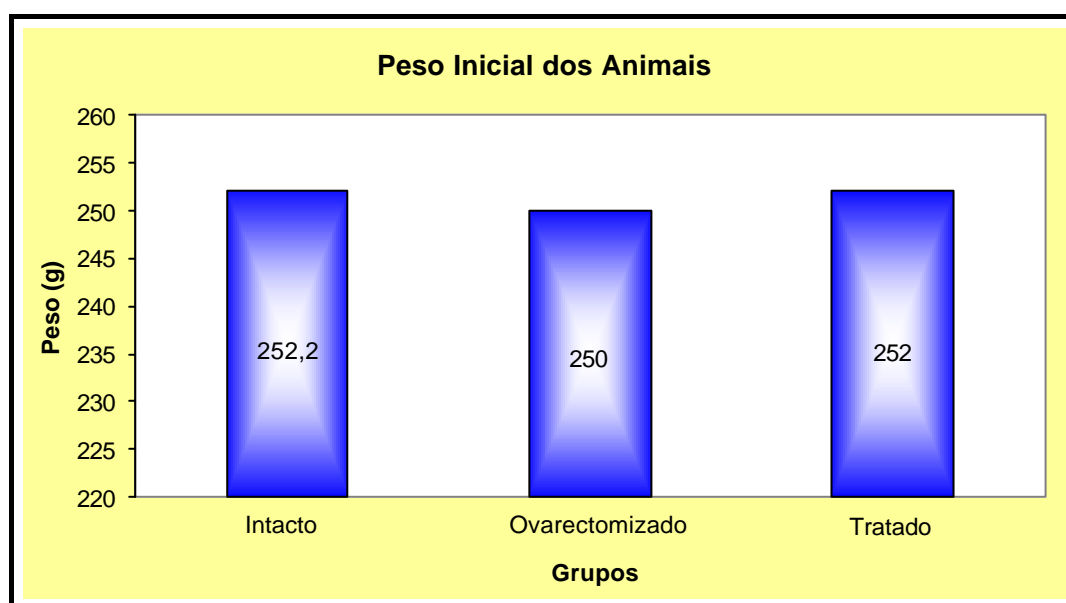


Figura 15- Média do peso inicial dos animais de todos os grupos.

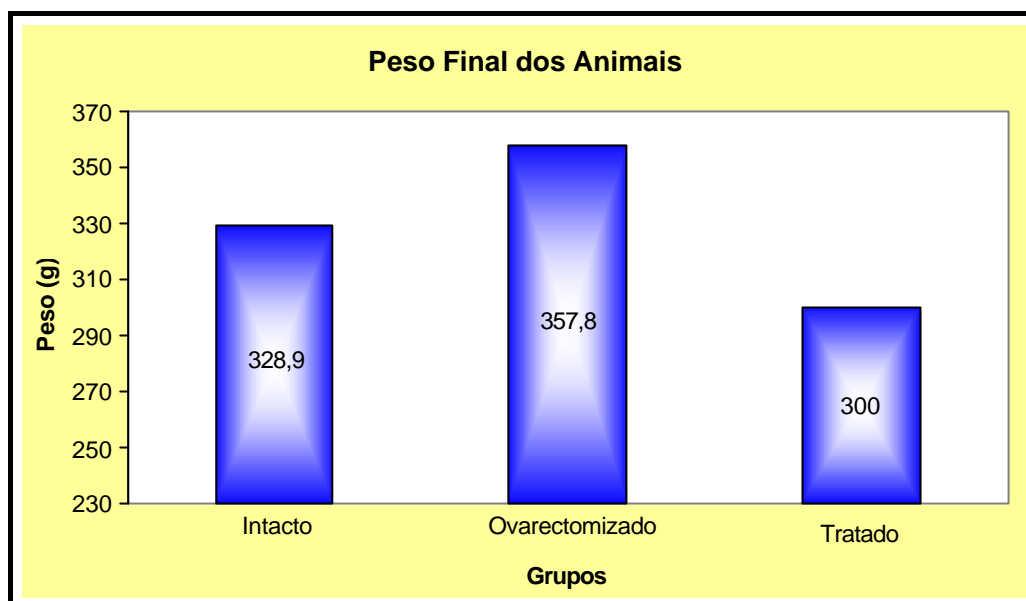


Figura 16- Média do peso final dos animais de todos os grupos.

Analisando os valores do peso corporal dos animais observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos no início do experimento.

Na comparação simultânea entre os grupos em relação ao peso final dos animais houve diferença estatística significativa. O grupo ovarectomizado apresentou um aumento significativo no peso final, obtido no dia do sacrifício, em relação ao grupo tratado.

O grupo intacto, após 9 semanas, teve um aumento de 30,4% no peso corporal, o grupo ovarectomizado apresentou um aumento de 43,1% e o grupo tratado teve um aumento de 19,1%, todos comparados com o seu respectivo peso inicial.

5.2 Peso e comprimento dos fêmures

Os valores médios e os desvios padrão do peso e comprimento dos fêmures podem ser vistos na Tabela 2 e Figura 17 e 18.

A análise simultânea entre os grupos não mostrou diferença significativa em relação ao peso dos fêmures, assim como o comprimento dos fêmures também não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos.

Tabela 2- Valores médios e desvios padrão do peso e comprimento dos fêmures.

Grupos	Peso do fêmur (g)	Comprimento do fêmur (mm)
Intacto	0,99±0,09	37,2±0,8
Ovarectomizado	0,99±0,10	37,3±1,0
Ovarectomizado e tratado	0,93±0,12	36,7±0,7

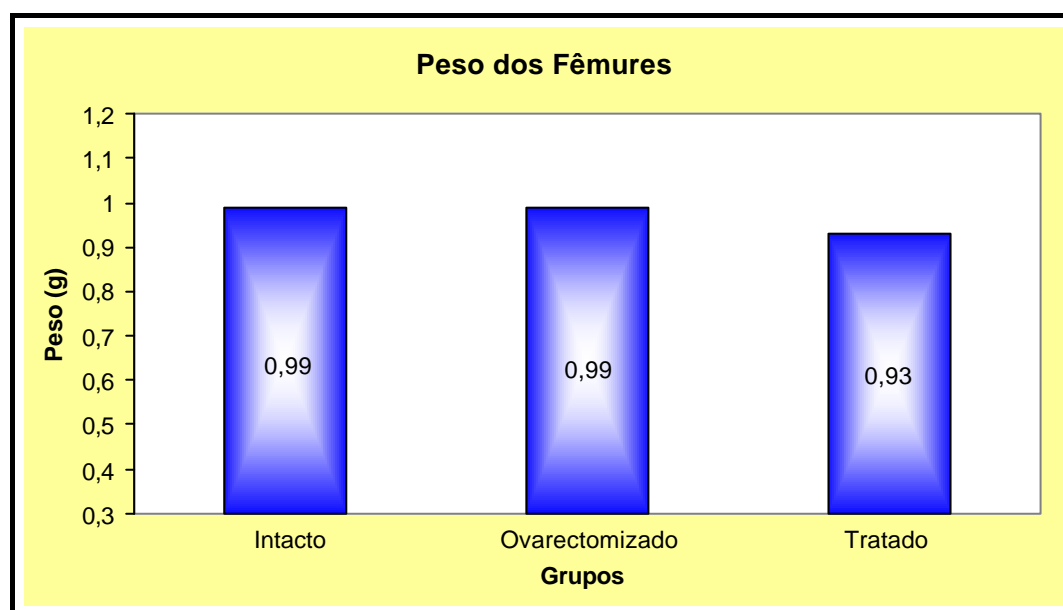


Figura 17- Média do peso dos fêmures de todos os grupos.

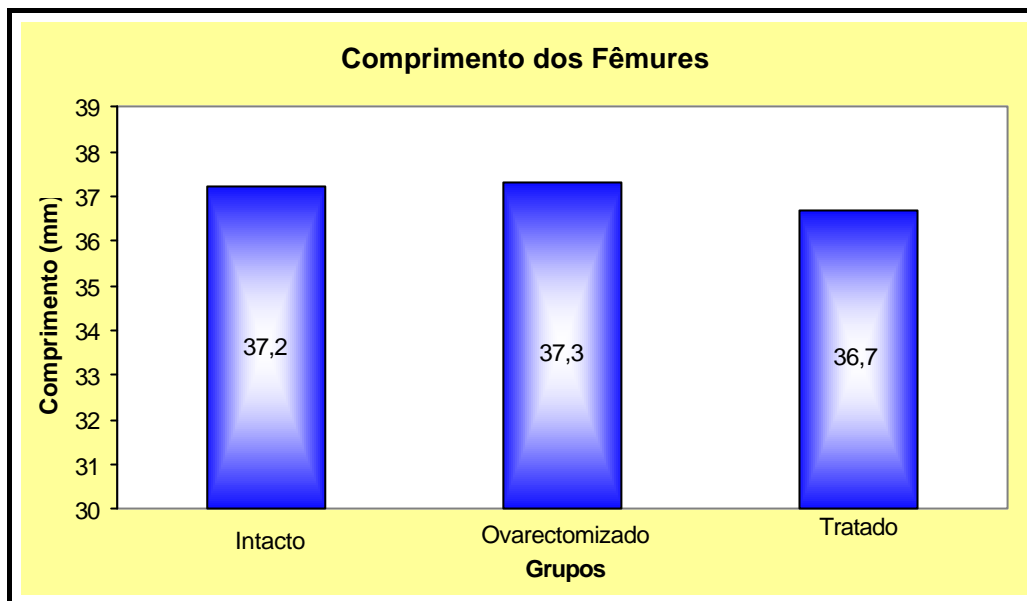


Figura 18- Média do comprimento dos fêmures de todos os grupos.

5.3 Curvas carga versus deformação

As curvas carga versus deformação dos grupos intacto, ovariectomizado e tratado estão apresentadas nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

Os valores das médias e desvios padrão do limite máximo dos fêmures dos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 3.

Para verificar se os parâmetros mecânicos de um membro e os parâmetros do membro contralateral foram similares, foi realizada a comparação do limite máximo entre os fêmures direito e esquerdo dos animais. Observou-se que a carga do limite máximo do lado esquerdo não foi estatisticamente diferente das obtidas no lado direito, ocorrendo o mesmo na avaliação da deformação do limite máximo.

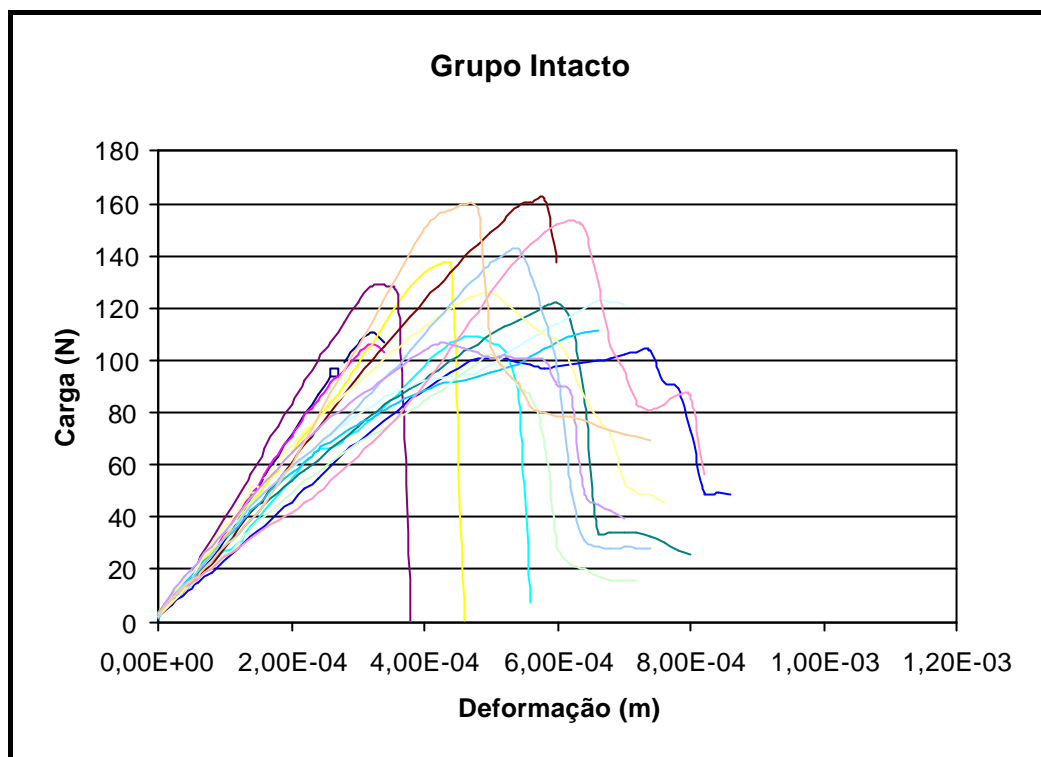


Figura 19- Curvas carga versus deformação dos 16 ossos analisados do grupo intacto.

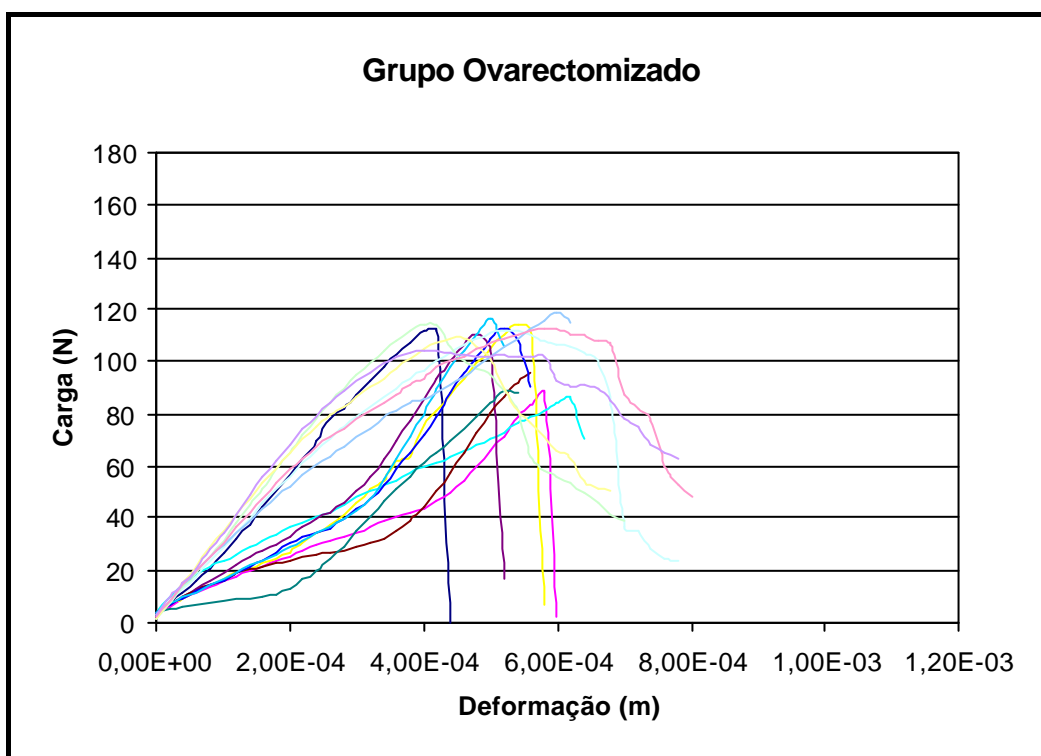


Figura 20- Curvas carga versus deformação dos 15 ossos analisados do grupo ovariectomizado.

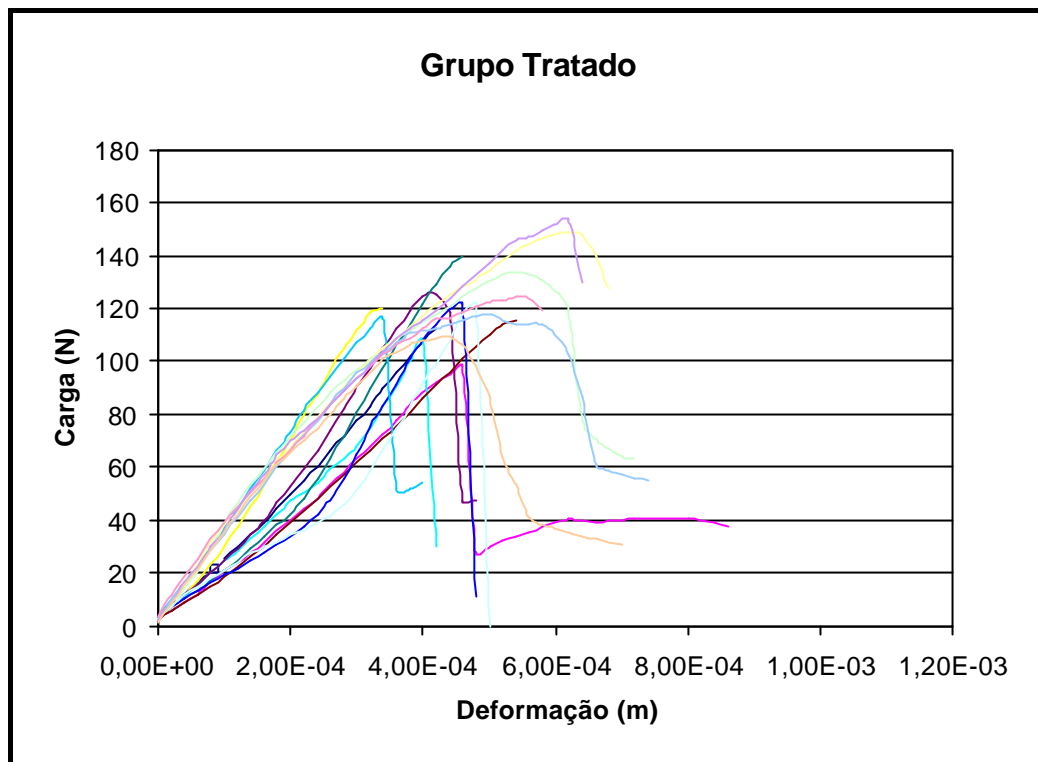


FIGURA 21- Curvas carga versus deformação dos 16 ossos analisados do grupo tratado.

Tabela 3-- Médias e desvios padrão do limite máximo (LM) dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.

Grupos	Carga do LM (N)	Deformação do LM (x10⁻³ m)
Intacto	125,2±20,3	0,51±0,13
Ovarectomizado	106,4±11,2	0,51±0,07
Tratado	122,9±14,9	0,47±0,08

5.3.1 Carga do limite máximo

O valor médio de carga do limite máximo para os ossos do grupo intacto foi $(125,2 \pm 20,3)N$, para os ossos do grupo ovariectomizado foi $(106,4 \pm 11,2)N$, e para os ossos do grupo tratado foi $(122,9 \pm 14,9)N$ (Figura 22).

A comparação simultânea entre os grupos intacto, ovariectomizado e tratado mostrou que houve diferença significativa. O grupo ovariectomizado apresentou uma diminuição significativa quando comparado com o grupo intacto e também na análise com o grupo tratado. Entre os grupos intacto e tratado não houve diferença estatística significativa.

O grupo ovariectomizado apresentou uma diminuição da carga do limite máximo de aproximadamente 15% em relação ao grupo intacto e o grupo tratado teve um aumento de aproximadamente 15,5% em relação ao grupo ovariectomizado.

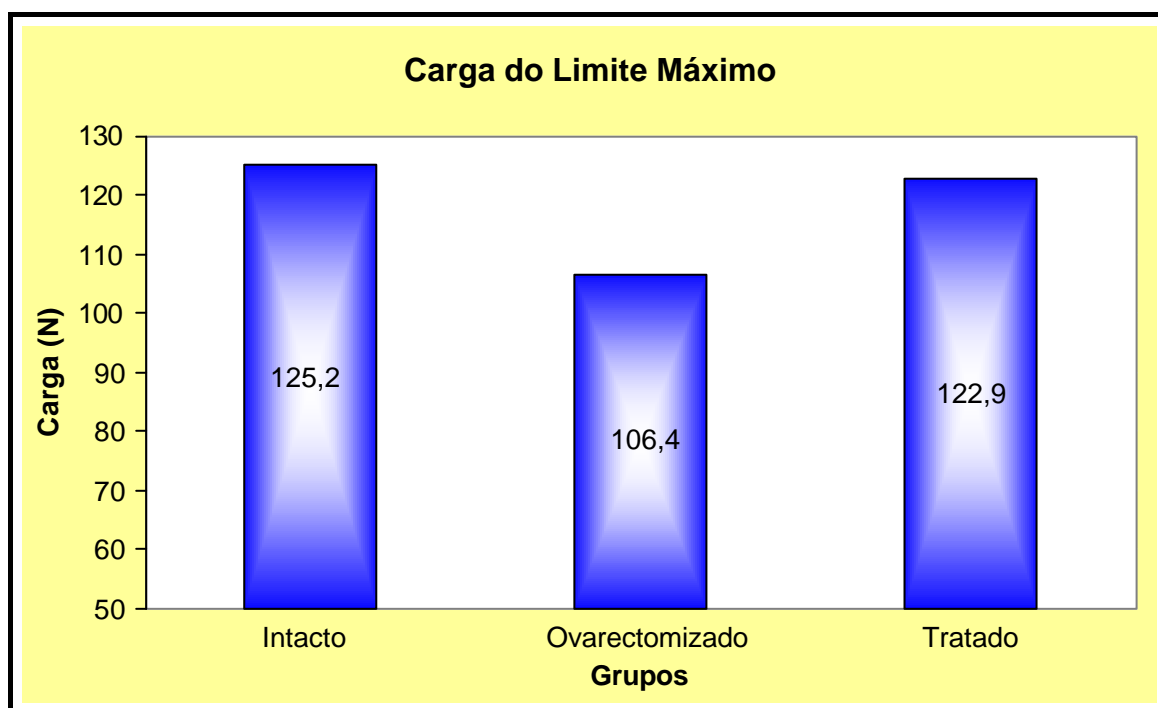


Figura 22- Média da carga do limite máximo de todos os grupos.

5.3.2 Deformação do limite máximo

O valor médio para deformação do limite máximo para os ossos do grupo intacto foi $(0,51 \pm 0,13) \times 10^{-3} \text{m}$, para os ossos do grupo ovariectomizado foi $(0,51 \pm 0,07) \times 10^{-3} \text{m}$ e para o grupo tratado foi $(0,47 \pm 0,08) \times 10^{-3} \text{m}$ (Figura 23).

A comparação simultânea entre os grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa (Figura 20).

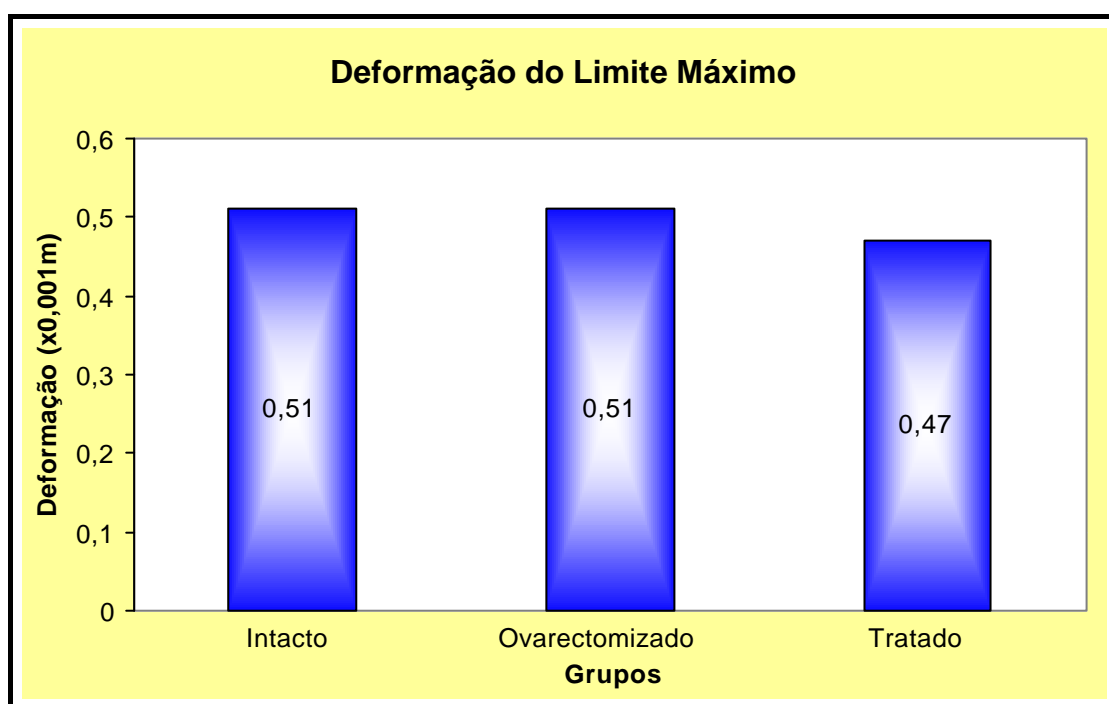


Figura 23- Média da deformação do limite máximo de todos os grupos.

6 DISCUSSÃO

A partir do estudo pioneiro sobre os efeitos benéficos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na aceleração da consolidação óssea realizado na década de 70 pelo Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte da Universidade de São Paulo- Campus São Carlos, diversas pesquisas, experimentais e clínicas, foram realizadas com sucesso, culminando com a aprovação deste importante recurso pelo respeitado órgão americano *Food and Drug Administration* em 1994 para acelerar a consolidação de fraturas recentes e em 2000 para o tratamento de pseudoartroses. A utilização do ultra-som pulsado de baixa intensidade na clínica pode tornar-se ainda mais abrangente com novas pesquisas envolvendo outras patologias.

A eficácia da aplicação do ultra-som de baixa intensidade no tratamento de fraturas de pacientes osteoporóticos com fraturas recentes e pseudoartrose também foi observada em estudos realizados por Frankel (1998 *apud* CARVALHO, 2001) e Mayer, Frankel e Rüter (2000). No entanto, não existem muitos trabalhos relatando o efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade em casos de osteoporose sem a ocorrência de fraturas.

Na revisão da literatura foi observado um número pequeno de estudos realizados sobre o ultra-som pulsado de baixa intensidade na perda de massa óssea (ARAI et al., 1993; CARVALHO, 2001; WARDEN et al., 2001a; WARDEN et al., 2001b) e nenhum trabalho analisou os efeitos dessa estimulação do ponto de vista mecânico em regiões ósseas de predominância trabecular.

Este trabalho surgiu do interesse em analisar a influência do ultra-som pulsado de baixa intensidade na preservação do limite máximo do fêmur de ratas ovariectomizadas. Optamos pela avaliação biomecânica do osso, visto que a diminuição da resistência mecânica do colo femoral é um indicador da perda de massa óssea e a resistência mecânica do osso também é,

provavelmente, o mais importante parâmetro relacionado ao risco de fratura (PENG et al., 1994).

No dia-a-dia o esqueleto recebe cargas mecânicas como o próprio peso da pessoa, a deambulação, a corrida, ou até mesmo em repouso, quando a balística cardíaca produz onda de choque cujo impulso atinge o osso, e para todos esses estímulos o osso, devido a sua piezoelectricidade, tem resposta elétrica, que por sua vez, aciona a divisão celular, mantendo o equilíbrio entre remodelamento e reabsorção (XAVIER e DUARTE, 1983).

A perda da função ovariana, geralmente na menopausa ou depois da cirurgia de ovariectomia, resulta em profundas alterações da homeostasia esquelética, prejudicando o processo de remodelamento ósseo, levando a perda do tecido ósseo (DEMPSTER e LINDSAY, 1993). Para o tratamento e prevenção da osteoporose são utilizados muitos recursos como, por exemplo, modificação na dieta, utilização de suplementos de cálcio, calcitonina, reposição hormonal e também os exercícios (LINDSAY, 1993). A presença de cargas mecânicas no osso, seja através da atividade física, ou mesmo das cargas presentes no dia-a-dia, são fundamentais para uma homeostasia esquelética. Em situações em que ocorre uma diminuição das cargas mecânicas sobre o osso como, por exemplo, em casos de pouco uso, o osso é parcialmente reabsorvido, levando a um quadro conhecido como osteoporose por desuso.

O ultra-som pulsado de baixa intensidade, ao ser aplicado em regiões ósseas, também fornece estímulos mecânicos caracterizados por uma baixa intensidade em torno de 30 mW/cm^2 , mas com uma frequência elevada, inúmeras vezes maior que qualquer frequência recebida pelo osso durante atividades físicas. Esta forma particular de geração de cargas mecânicas pelo ultra-som é capaz de estimular o metabolismo e pode contribuir para um adequado remodelamento ósseo, de forma segura e direcionada a regiões específicas.

Neste estudo foi utilizada a rata como animal pela facilidade de mantê-la em laboratório, baixo custo e, principalmente, por possuir os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda da massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, assim como na osteoporose, semelhantes aos dos humanos, sendo considerada um bom modelo de

osteopenia. Ao contrário, grandes animais, além do maior custo e dificuldades em mantê-los em laboratório (FROST e JEE, 1992), possuem a rede trabecular nos corpos vertebrais e no colo femoral muito densa comparada com os humanos, sendo difícil induzir a perfuração osteoclástica (MOSEKILDE, 1995).

A idade dos animais é um fator importante nos estudos da perda óssea, pois a diminuição óssea que ocorre após a ovariectomia depende da idade do animal em que foi realizada a cirurgia. Assim, a perda óssea é maior e ocorre mais rapidamente em animais mais jovens, enquanto animais mais idosos sofrem menor perda e de forma mais lenta (THOMPSON et al., 1995). Por isso, neste estudo foram utilizados animais jovens.

Apesar da disponibilidade de vários modelos de osteopenia experimental, como a indução por glicocorticóide, imobilização das patas do animal, deficiência de vitaminas e cálcio, envelhecimento, orquiectomia, entre outros (MILLER, BOWMAN e JEE, 1995), neste estudo foi utilizada a cirurgia de ovariectomia para indução da perda de massa óssea. A eleição deste modelo baseou-se na semelhança das alterações que ocorrem na rede trabecular de ratas ovariectomizadas com as alterações observadas no esqueleto humano relacionadas à deficiência estrogênica (MOSEKILDE, 1995). Além disso, a ovariectomia é o modelo mais popular para o estudo de eventos associados com a osteoporose pós-menopausal (MILLER, BOWMAN e JEE, 1995), é um procedimento fácil de ser realizado e os efeitos da ovariectomia sobre o esqueleto do animal se manifestam rapidamente. A utilização desta cirurgia neste experimento permitiu uma rápida recuperação dos animais e não foi constatado nenhum caso de infecção pós-operatória.

Relatos da literatura demonstram que para a indução da osteopenia em ratas jovens são suficientes um mês ou menos (KALU, 1991; LI, SHEN e WRONSKI, 1997; THOMPSON et al., 1995). Outros autores, ao analisarem regiões ósseas trabeculares após aproximadamente 40 dias de ovariectomia, também observaram os efeitos da deficiência estrogênica como a diminuição significativa do volume ósseo trabecular e da densidade mineral óssea (DEMPSTER et al, 1995; PENG et al, 1994).

A eutanásia dos animais para análise do parâmetro mecânico dos ossos foi realizada 9 semanas (63 dias) após a cirurgia de ovariectomia, pois desta

maneira permitimos a instalação da osteopenia, ultrapassando o limite encontrado na literatura.

A importância da prevenção da perda de massa óssea foi destacada por Dequeker (1994), que afirmou ser mais fácil realizar a manutenção da massa óssea que a sua restauração. Assim, neste trabalho, a aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade no grupo tratado foi iniciada no 1 dia pós-operatório de ovariectomia, antes da instalação da osteopenia, visando um tratamento preventivo de perda de massa óssea que foi avaliado através do parâmetro limite máximo.

Um dos dados avaliados foi o peso corporal dos animais, tanto o inicial quanto o final, obtido no dia da eutanásia.

A análise do peso corporal inicial mostrou que não houve diferença entre os grupos no início do experimento, indicando que se tratava de grupos comparáveis.

Em relação ao peso corporal final dos animais do grupo ovariectomizado, o valor médio foi maior que o valor do grupo intacto, confirmando os relatos de Wronski et al. (1987) que afirmam que com a ovariectomia ocorre um aumento no ganho do peso, estando este relacionado a um aumento na ingestão alimentar. O grupo intacto, após 9 semanas, teve aumento de 30,4% e o grupo ovariectomizado sofreu aumento de 43,1% no peso corporal. Embora o valor médio do peso corporal do grupo ovariectomizado tenha sido maior comparado com o grupo intacto, não houve diferença estatística entre esses grupos, sendo similar ao encontrado por Kubo et al. (1999) que não encontraram diferenças significativas no peso corpóreo entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle no período de 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia de ovariectomia.

Segundo Thompson et al (1995), o maior ganho de peso corporal em ratas ovariectomizadas comparada com ratas controles está relacionado a um aumento de gordura corpórea.

No caso do grupo tratado houve diminuição significativa do peso corporal em relação ao grupo ovariectomizado. Após 9 semanas, o grupo tratado teve um ganho de peso de 19,1% em contraste com um ganho de peso de 43,1% do grupo ovariectomizado. Possivelmente houve uma diminuição na ingestão alimentar causada pelo estresse.

De maneira similar, Warden et al. (2001b), ao analisarem ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com ultra-som ativo e ratas ovariectomizadas que permaneceram em gaiolas, observaram que houve diminuição significativa no ganho de peso dos animais tratados e esses autores também acreditam que o estresse seja o responsável por reduções no consumo de comida.

Carvalho (2001) observou uma diminuição significativa no ganho de peso do grupo de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com ultra-som em comparação ao grupo de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento placebo, estabelecendo uma correlação entre ultra-som e um menor ganho de peso. Não há na literatura pesquisada resultados semelhantes ou possíveis explicações para tal fato. Warden et al. (2001b) mostrou que o ganho de peso não foi influenciado pelo ultra-som, ao comparar grupos de ratas ovariectomizadas tratadas com ultra-som ativo e grupos de ratas ovariectomizadas tratadas com ultra-som inativo.

Apesar do menor ganho de peso em ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com ultra-som placebo em relação às ratas ovariectomizadas que permaneceram em gaiolas no estudo de Warden et al (2001b), foi observado por esses autores que não houve diferenças na densitometria de dupla energia de raios-x (DXA *in vivo* e *ex vivo*) e na avaliação por histomorfometria entre esses dois grupos. Assim, independente do animal ser submetido à manipulação para o tratamento placebo ou não, a ovariectomia resultou em perda de massa óssea de forma semelhante, ocorrendo diminuição da densidade mineral óssea e do conteúdo mineral ósseo, diminuição do volume trabecular e do número de trabéculas, aumento na separação de trabéculas e diminuição na sua espessura quando comparados com animais não ovariectomizados. Estes resultados demonstram que, no presente estudo, o fato de se ter utilizado animais ovariectomizados controles que permaneceram em gaiolas não altera a perda de massa óssea, sendo esta semelhante mesmo se os animais fossem submetidos à manipulação para um tratamento simulado.

O comprimento assim como o peso dos fêmures, nos diferentes grupos, não foram estatisticamente diferentes. Estes dados concordam com o estudo de Peng et al. (1994), que não evidenciaram diferenças significativas entre o

comprimento e o peso de cinza dos fêmures do grupo ovariectomizado e o grupo não ovariectomizado.

Apesar da osteoporose ser caracterizada como uma doença sistêmica, onde há redução da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, o osso trabecular tende a ser mais sensível a influências metabólicas como a deficiência estrogênica. Assim a perda óssea ocorre mais rapidamente no osso trabecular que no osso cortical (MANOLAGAS e JILKA, 1995).

Pela presença de osso trabecular, a extremidade proximal do fêmur de ratas foi escolhida para análise do parâmetro mecânico.

O ensaio de flexo-compressão do fêmur permitiu analisar a região do colo femoral, que possui predominantemente osso trabecular (STENSTRÖM et al., 2000), considerada um importante sítio esquelético para testes biomecânicos, além de ser uma região clinicamente relevante (MOSEKILDE, 1995).

Após o teste de flexo-compressão foi observado que as fraturas estavam localizadas no colo do fêmur, algumas associadas à fratura da cabeça femoral. Estudos que analisaram a extremidade proximal do fêmur também encontraram a mesma localização da fratura em sua maior parte (ALHO, HUSBY e HØISETH, 1988; JÄMSÄ, TUUKKANEN e JALOVAARA, 1998; PENG et al., 1994).

A utilização de ossos inteiros permitiu avaliar o limite máximo do osso como estrutura intacta, e não apenas como material, pois segundo relatos de Hayes e Carter (1971), refletem melhor a capacidade mecânica. O comportamento mecânico ao analisarmos ossos inteiros não depende apenas da massa do tecido e suas propriedades materiais, mas também da sua geometria e arquitetura (EINHORN, 1992).

Muitos estudos, experimentais e clínicos, selecionam um membro para ser submetido a um determinado tratamento e o membro contralateral para controle, considerando que os membros possuem simetria bilateralmente. Hoyer e Lippert (1982), ao analisarem fêmures, tíbias e úmeros de ratos, mostraram que as propriedades mecânicas do membro esquerdo e direito são similares, ou seja, não apresentaram diferença significativa.

Assim como no estudo citado anteriormente, as análises da carga e deformação do limite máximo deste trabalho não apresentaram diferenças

significativas entre os lados direito e esquerdo, justificando, deste modo, o uso de ambos os membros dos animais neste experimento. Apesar de tal simetria bilateral nas propriedades mecânicas, não utilizamos um membro para controle e o contralateral para tratamento. Os grupos foram constituídos por animais distintos a fim de possibilitar o tratamento simultâneo em ambos os fêmures, no caso do grupo tratado, e para garantir que as ondas ultra-sônicas não penetrassem no membro controle, pois se fosse utilizado um membro do animal para controle e o contralateral para tratamento poderia haver uma influência das ondas sonoras no lado controle, visto que o rato é um animal de pequeno porte e a extremidade proximal do fêmur direito e a do esquerdo ficam próximas.

O valor médio de carga do limite máximo do grupo ovariectomizado obtido no presente estudo foi significativamente menor que o valor médio do grupo intacto, fornecendo indícios de que a perda de massa óssea provocou diminuição deste parâmetro mecânico.

Provavelmente a cirurgia de ovariectomia levou à perda de massa óssea, ocorrendo assim a diminuição dos minerais do osso, que são os responsáveis pela força suportada pelo osso.

Apesar do osso cortical ser menos afetado pela ovariectomia, de maneira semelhante ao que ocorre na osteoporose pós-menopausal, é de consenso de diversos estudos que o osso trabecular é afetado, ocorrendo diminuição da densidade e do conteúdo mineral ósseo, diminuição do volume ósseo e também deterioração da microarquitetura, incluindo diminuição no número de trabéculas e perda de suas conectividades (DEMPSTER et al., 1995; LI, SHEN e WRONSKI, 1997; PENG et al., 1994; THOMPSON et al., 1995). O osso trabecular é formado por uma rede de trabéculas, que possui importante função estrutural, arquitetada para transmitir forças aplicadas no osso de uma maneira altamente eficiente. Nos corpos vertebrais, por exemplo, o osso trabecular suporta aproximadamente a metade da carga imposta e transmite forças mecânicas ao córtex. Conhecendo-se a importante contribuição do osso trabecular do ponto de vista mecânico, fica claro que doenças que levam a ruptura da conectividade entre as trabéculas tornam essas regiões ósseas trabeculares propensas à falência mecânica (KANIS, 1996). Isto justifica a

diminuição da resistência do osso às cargas mecânicas após a ovariectomia encontrada nesse estudo.

Assim, a diminuição da carga do limite máximo dos animais do grupo ovariectomizado em relação aos do grupo intacto foi reflexo da diminuição dos minerais, associado a uma deterioração da microarquitetura do osso trabecular.

Resultados similares foram obtidos no estudo de Peng et al. (1994), que analisaram o colo femoral de ratas após 6 semanas de ovariectomia e encontraram diminuição significativa de 15,8% da carga máxima do grupo ovariectomizado em relação ao grupo não ovariectomizado.

A comparação do valor médio de carga do limite máximo entre os grupos tratado e ovariectomizado mostrou que houve diferença significativa, ou seja, o valor de carga do limite máximo do grupo tratado foi estatisticamente maior que o do grupo ovariectomizado. Esse resultado indica um possível benefício na estrutura óssea com a aplicação do ultra-som pulsado de baixa intensidade com os parâmetros utilizados nesse experimento.

Entre os grupos tratado e intacto não houve diferença significativa nesse parâmetro mecânico, sugerindo que o ultra-som tenha contribuído na preservação da carga do limite máximo.

Desta forma, este estudo encontrou resultados positivos no parâmetro mecânico carga do limite máximo com a estimulação ultra-sônica, confirmando que pode existir um tratamento potencial deste recurso em casos de perda óssea, como encontrado por Arai et al. (1994) em estudo clínico e por Carvalho (2001) em estudo experimental.

Estudos futuros em humanos com um grande número de indivíduos são importantes. Em relação aos parâmetros do ultra-som, é interessante utilizar aqueles que são benéficos para o tratamento de fraturas, podendo-se pesquisar também paralelamente alguns parâmetros diferentes na tentativa de buscar os melhores parâmetros para casos de perda de massa óssea.

Com a comprovação científica dos efeitos benéficos do ultra-som de baixa intensidade na perda de massa óssea, será interessante a aplicação clínica deste recurso em locais mais acometidos por fraturas como a extremidade proximal do fêmur e a distal do rádio, em especial naqueles pacientes com grande tendência a desenvolver a osteoporose, ou que já a tem, e que possuem dificuldades de executar atividades físicas ou limitações, como

por exemplo ficar acamado em decorrência de alguma cirurgia, que prejudicam o metabolismo ósseo. Desta forma, a utilização do ultra-som seria importante para prevenir perda de massa óssea, pois se sabe que uma pequena diminuição na taxa de perda óssea pode levar a uma diminuição significativa no número de fraturas por osteoporose (RIGGS e MELTON III, 1995).

Um outro possível benefício do ultra-som pulsado de baixa intensidade na prevenção de fraturas osteoporóticas está relacionado aos microdanos. Tem sido proposto que os microdanos ocorrem no osso e, principalmente em pacientes idosos e osteoporóticos pode ocorrer a propagação dessas microlesões e levar a microfraturas trabeculares, que contribuem para a fragilidade óssea (KANIS, 1996). O ultra-som pulsado de baixa intensidade é capaz de estimular o metabolismo ósseo em fraturas quando este, por alguma razão biológica, não ocorre de forma normal e também acelera a consolidação de fraturas. Visto que essas microfraturas trabeculares são normalmente reparadas, com formação de microcalos, que são similares aos das fraturas de ossos longos (KAPLAN et al, 1994), existe a possibilidade do ultra-som contribuir na reparação dessas microfraturas, de tal forma a acelerar esta reparação ou estimular o metabolismo ósseo em microfraturas se este estiver prejudicado, e assim evitar o acúmulo desses danos ósseos, e conseqüentemente melhorar a competência mecânica da estrutura óssea.

Assim este método representa uma intervenção potencial não farmacológica para a osteopenia e osteoporose e poderá complementar as outras formas de tratamento, com a vantagem de ser seguro, afinal a intensidade utilizada em torno de 30 mW/cm^2 é não térmica e não destrutiva. Vale ressaltar que não há na literatura reações adversas ou complicações relativas ao uso deste aparelho.

7 CONCLUSÕES

- A resistência mecânica, avaliada pela carga do limite máximo, da extremidade proximal do fêmur do grupo de ratas ovariectomizadas diminuiu após 9 semanas de cirurgia comparando-se com o grupo de ratas intactas, não ovariectomizadas.
- O ultra-som pulsado de baixa intensidade, com os parâmetros utilizados nesse estudo, influenciou a resistência mecânica da extremidade proximal do fêmur de ratas do grupo tratado (ovariectomizado e estimulado com ultra-som), aumentando a carga do limite máximo em relação às ratas do grupo ovariectomizado (não estimulado).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, A.; HUSBY, T.; HØISETH, A. (1988). Bone mineral content and mechanical strength. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n.227, p.292-7, feb.

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

AVIOLI, L.V.; KLEEREKOPER, M. (1998). Osteoporosis: the clinical problem. In: GENANT, H.K.; GUGLIELMI, G.; JERGAS, M. *Bone densitometry and osteoporosis*. 1.ed. Berlin: Springer. Cap.1, p.1-19.

BLUMSOHN, A.; EASTELL, R. (1995). Age-related factors. In: RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. *Osteoporosis. Etiology, diagnosis, and management*. 1.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. Cap.7, p.161-82.

CARNEIRO, R.A. (2000). Osteoporose primária. In: COSSERMELLI, W. *Terapêutica em reumatologia*. 1.ed. Lemos editorial. Cap 116, p.1035-45.

CARNEIRO, R.A. (2001). Epidemiological aspects of osteoporosis in Brazil. *Bone (Abstracts)*, v.29, n.3,p.298, 2001.

CARVALHO, D.C.L. (2001). *Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas*. 82p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

CHAIMOWICZ, F. (1997). A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. *Revista Saúde Pública*, v.31, n.2, p.184-200.

CHARMAN, R.A. (1996). Propriedades elétricas das células e dos tecidos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. *Eletroterapia de clayton*. 10.ed. São Paulo: Manole. Cap.2, p.31-45.

CHRISTENSEN, D.A. (1988). *Ultrasonic bioinstrumentation*. John Wiley & Sons.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. (1991). Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*, v.90, p.107-10, jan.

CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Journal American Medical Association*, v.285, n.6, p.785-95, feb.

COOK, S.D.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; HECKMAN, J.D.; KRISTIANSEN, T.K. (1997). Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n.337, p.198-207, apr.

DÂNGELO, J.G.; FATTINI, C.A. (2002). *Anatomia básica dos sistemas orgânicos*. São Paulo: Atheneu.

DEMPSTER, D.W. (1995). Bone remodeling. In: RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. *Osteoporosis*. Etiology, diagnosis, and management. 1.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. Cap.3, p.67-91.

DEMPSTER, D.W.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; LINDSAY, R.; SHEN, V. (1995). Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone*, v.16,n.1, p.157-61, jan.

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

DEQUEKER, J. (1994). Management of osteoporosis. In: KLIPPEL, J.H.; DIEPPE, P.A. *Rheumatology*. Mosby. Cap.34, p.1-6.

DINNO, M.A.; DYSON, M.; YOUNG, S.R.; MORTIMER, A.J.; HART, J.; CRUM, L.A. (1989). The significance of membrane changes in the safe and effective

use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Physics in Medicine and Biology*, v.34, n.11, p.1543-52, nov.

DUARTE, L.R. (1977). Estimulação do calo ósseo. Tese (Livre-docência) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

DUARTE, L.R. (1983). The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v.101, p.153-9.

DYSON, M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.3, p.116-20, mar.

EINHORN, T.A. (1992). Bone strength: the bottom line. *Calcified Tissue International*, v.51, p.333-9.

EINHORN, T.A. (1996a). The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press. Cap.1, p.3-22.

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

ERIKSEN, E.F.; VESTERBY, A.; KASSEM, M.; MELSEN, F.; MOSEKILDE, L. (1993). Bone remodeling and bone structure. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. *Physiology and pharmacology of bone*. Berlin: Springer-Verlag. Cap.2, p.67-109.

FRANKEL, V.H. (1998). Results of prescription use of pulsed ultrasound therapy in fracture management. In: SZABO, Z. et al. *Surgical technology international VII*. San Francisco: Universal Medical Press. p.389-93 *apud* CARVALHO, D.C.L. (2001). *Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas*. 82p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

FROST, H.M.; JEE, W.S.S. (1992). On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone and Mineral*, v.18, p.227-36.

GALI, J.C. (2001). Osteoporose. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.9, n.2, p.53-62, abr/jun.

GAMA, L.O.R. (2002). *Artrodese atlanto-axial em cães tratada por ultra-som de baixa intensidade*. 78p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

GLAZER, P.A.; HEILMANN, M.R.; LOTZ, J.C.; BRADFORD, D.S. (1998). Use of ultrasound in spinal arthrodesis. *Spine*, v.23, n.10, p.1142-8.

HADJIARGYROU, M.; MCLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. (1998). Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n.355S, p.S216-S29, oct.

HAIBO, Z.; ZHIDAO, X.; GUOPING, C.; JINGYUAN, D.; TONGBO, Z.; LIN, S. (1998). Expression of type-I collagen and matrix metalloproteinase-9 mRNA in bone of castrated adult female rats: effects of estrogen. *Chinese Medical Journal*, v.111, n.6, p.551-5.

HAYES, W.C.; CARTER, D.R. (1971). Biomechanics of bone. In: SIMMONS, D.J.; KUNIN, A.S. *Skeletal research*. New York: Academic Press. p.263-300.

HAYES, W.C.; MYERS, E.R. (1995). Biomechanics of fractures. In: RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. Philadelphia: Lippincott-Raven. Cap.4, p.93-114.

HECKMAN, J.D.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; KILCOYNE, R.F. (1994). Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.76-A, n.1, p.26-34, jan.

HIGHTOWER, L. (2000). Osteoporosis: pediatric disease with geriatric consequences. *Orthopaedic Nursing*, v.19, n.5, p.59-62.

HOYER, H.E.; LIPPERT, H. (1982). Biomechanical changes in long limb bones of Han-wistar rats during postnatal development. *Anatomy and Embryology*, v.164, p.101-11.

[HTTP://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html](http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html) - Acesso em 26 set. 2003.

[HTTP://www.med.uni-jena.de/klinikmagazin/archiv/km102/kmonline/sprechstunde.htm](http://www.med.uni-jena.de/klinikmagazin/archiv/km102/kmonline/sprechstunde.htm) - Acesso em: 20 jul. 2003.

[HTTP://www.scanco.ch/images/uct_rat_femur.jpeg](http://www.scanco.ch/images/uct_rat_femur.jpeg) - Acesso em: 20 jul. 2003.

IQBAL, M.M. (2000). Osteoporosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Southern Medical Journal*, v.93, n.1, p.2-18, jan.

ITO, M.; AZUMA, Y.; OHTA, T.; KOMORIYA, K. (2000). Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.26, n.1, p.161-6.

JÄMSÄ, T.; TUUKKANEN, J.; JALOVAARA, P. (1998). Femoral neck strength of mouse in two loading configurations: method evaluation and fracture characteristics. *Journal of Biomechanics*, v.31, p.723-9.

JINGUSHI, S.; AZUMA, V.; ITO, M.; HARADA, Y.; TAKAGI, H.; OHTA, T.; KOMORIYA, K. (1998). Effects of non-invasive pulsed low-intensity ultrasound on rat femoral fracture. In: *Proceedings of the Third World Congress of Biomechanics*, p.175b *apud* RUBIN, C.; BOLANDER, M.; RYABY, J.P.; HARDJIARGYROU, M. (2001). The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.83-A, n.2, p.259-70, feb.

JOHNSTON, C.C.; SLEMENDA, C.W. (1995). Pathogenesis of osteoporosis. *Bone*, v.17, n.2, p.19S-22S, aug.

KAASTAD, T.S.; REIKERAS, O.; HALVORSEN, V.; FALCH, J.A.; OBRANT, K.J.; NORDSLETTEN, L. (2001). Vitamin D deficiency and ovariectomy reduced the strength of the femoral neck in rats. *Calcified Tissue International*, v.69, n.2, p.102-8, aug.

KALU, D.N. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, v.15, p.175-92.

KANIS, J.A. (1996). *Textbook of osteoporosis*. Oxford: Blackwell Science.

KANIS, J.A.; WHO study group. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis:synopsis of a WHO report. *Osteoporosis International*, v.4, p.368-81.

KAPLAN, F.S. (1995). Prevenção e tratamento da osteoporose. *Clinical Symposia*, v.47, n.1, p.3-38.

KAPLAN, F.S.; HAYES, W.C.; KEAVENY, T.M.; BOSKEY, A.; EINHORN, T.A.; IANNOTTI, J.P. (1994). Form and function of bone. In: SIMON, S.R.; WILSON, J. *Orthopaedic basic science*. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Cap.4, p.127-184.

KAUFMAN, J.J.; EINHORN, T.A. (1993). Ultrasound assessment of bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.8, p.517-25.

KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A.; SEMEINS, C.M.; AJUBI, N.E.; FRANGOS, J.A.; NIJWEIDE, P.J.; BURGER, E.H. (1995). Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB* 9, p.441-5 *apud* EINHORN, T.A. (1996b). Biomechanics of bone. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press. Cap.3, p.25-37.

KOKUBO, T.; MATSUI, N.; FUJIOKA, H.; TSUNODA, M.; MIZUNO, K. (1999). Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E₂ production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.256, n.2, p.284-7.

KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.79-A, n.7, p.961-73, july.

KUBO, T.; SHIGA, T.; HASHIMOTO, J.; YOSHIOKA, M.; HONJO, H.; URABE, M.; KITAJIMA, I.; SEMBA, I.; HIRASAWA, Y. (1999). Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.68, p.197-202.

LEHMANN, J.F.; LATEUR, B.J. (1984). Diatermia e terapia pelo calor e frio superficiais. In: KOTTKE, F.J.; STILLWELL, G.K.; LEHMANN, J.F. *Krusen: Tratado de medicina física e reabilitação*. 3.ed. São Paulo: Manole. Cap.13, p.281-359.

LEWIN, P.A.; ZISKIN, M.C. (1993). An overview of ultrasonic exposimetry and its clinical relevance. In: ZISKIN, M.C.; LEWIN, P.A. *Ultrasonic exposimetry*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press. Cap.1, p.1-8.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S. (1996) Osteoblast biology. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press. Cap.2, p.23-59.

LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T.J. (1997). Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*, v.20, n.1, p.55-61, jan.

LINDSAY, R. (1993). Prevention and treatment of osteoporosis. *The Lancet*, v.341, p.801-5, mar.

LINDSAY, R. (1995). Estrogen deficiency. In: RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. *Osteoporosis*. Etiology, diagnosis, and management. 1.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. Cap.6, p.133-60.

LOW, J.; REED, A. (1994). *Electrotherapy explained*. Principles and practice. 2.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.

LUCENA, C. (1991). *Hiper e hipo termoterapia*. 1.ed. Curitiba: Lovise.

MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *The England Journal of Medicine*, v.332, n.5, p.305-11.

MARKS, S.C.; HERMEY, D.C. (1996). The structure and development of bone. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press. Cap.1, p.3-14.

MAYER, E.; FRANKEL, V.; RÜTER, A. (2000). Ultrasound – an alternative healing method for nonunions? *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v.120, p.1-8.

MEKRALDI, S.; LAFAGE-PROUST, M.H.; BLOOMFIELD, S.; ALEXANDRE, C.; VICO, L. (2003). Changes in vasoactive factors associated with altered vessel morphology in the tibial metaphysis during ovariectomy-induced bone loss in rats. *Bone*, v.32, p.630-41, june.

MILLER, S.C.; BOWMAN, B.M.; JEE, W.S.S. (1995). Available animal models of osteopenia- small and large. *Bone*, v.17, n.4, p.117S-23S, oct.

MOSEKILDE, L. (1995). Assessing bone quality – animals models in preclinical osteoporosis research. *Bone*, v.17, n.4, p.343S-52S, oct.

MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J.S.; ORHII, P.B.; KALU, D.N. (1998). Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone*, v.23, n.4, p.343-52, oct.

NAGARAJA, S.; LAIB, A.; GULDBERG, R.E. (2003). Assessment of trabecular bone microdamage and microfracture. In: SUMMER BIOENGINEERING CONFERENCE, 2003, Florida. Disponível em: <http://www.tulane.edu/~sbc2003/pdfdocs/0375.PDF>. Acesso em: 01 set. 2003.

NARUSE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; AZUMA, Y.; ITO, M.; OOTA, T.; KAMEYAMA, K.; ITOMAN, M. (2000). Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.268, n.1, p.216-20.

NIGG, B.M.; GRIMSTRON, S.K. (1994). Bone. In: NIGG, B.M.; HERZOG, W. *Biomechanics of the musculo-skeletal system*. 1.ed. Chichester: John Wiley & Sons. Cap.2.1, p.48-78.

NOBEL SYMPOSIUM. (2000). Estrogens and women's health – benefit or treat? *Journal of Steroid Biochemistry e Molecular Biology*, v.74, p.243.

NORDIN, B.E.C. (1997). Calcium and osteoporosis. *Nutrition*, v.13, n.7/8, p.664-86.

NYBORG, W.L.; WU, J. (1993). Relevant field parameters with rationale. In: ZISKIN, M.C.; LEWIN, P.A. *Ultrasonic exposimetry*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press. Cap.4, p.85-112.

OSTEOPOROSE: Informações para médicos. (1997). Disponível em: <<http://uddo.com/osteoporose/osteo.htm>>. Acesso em: 26 out. 2001.

OTT, S.M. (1990). Editorial: attainment of peak bone mass. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v.71, p.1082A-C.

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

PATRICK, M. (1978). Applications of therapeutic pulsed ultrasound. *Physiotherapy*, v.64, n.4, p.103, apr.

PEEL, N.; EASTELL, R. (1995). ABC of rheumatology: osteoporosis. *British Medical Journal*, v.310, p.989-92, apr.

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H.K. (1994). The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone*, v.15, n.5, p.523-32.

PILLA, A.A.; MONT, M.A.; NASSER, P.R.; KLAN, S.A.; FIGUEIREDO, M.; KAUFMAN, J.J.; SIFFERT, R.S. (1990). Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *Journal of Orthopaedic Trauma*, v.4, p.246-53.

RECKER, R.R. (1996). Bone remodeling abnormalities in osteoporosis. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press. Cap.35, p.703-13.

RENNÓ, A.C.M.; DRIUSSO, P.; FERREIRA, V.; OISHI, J. (2001). Atividade física e osteoporose: uma revisão bibliográfica. *Fisioterapia em movimento*, v.13, n.2, p. 49-53, mar.

RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. (1995). The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*, v.17, n.5, p.505S-11S, nov.

RUBIN, C.; BOLANDER, M.; RYABY, J.P.; HADJIARGYROU, M. (2001). The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.83-A, n.2, p.259-70, feb.

RYABY, J.T.; BACHNER, E.J.; BENDO, J.A.; DALTON, P.F.; TANNENBAUM, S.; PILLA, A.A. (1989). Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc*, v.14, p.15 *apud* RUBIN, C.; BOLANDER, M.; RYABY, J.P.; HADJIARGYROU, M. (2001). The use of low-intensity ultrasound to accelerate

the healing of fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.83-A, n.2, p.259-70, feb.

RYABY, J.T.; MATTHEW, J.; DUARTE-ALVES, P. (1992). Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. *Trans Orthop Res Soc*, v.17, p.590 *apud* RUBIN, C.; BOLANDER, M.; RYABY, J.P.; HADJIARGYROU, M. (2001). The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.83-A, n.2, p.259-70, feb.

SAMBROOK, P.N.; LEONG, K.H. (1997). Osteoporosis. In: HOWE, H.S.; FENG, P.H. *Textbook of clinical rheumatology*. Singapore: National Arthritis Foundation, Cap.14, p.263-76.

SHIMAZAKI, A.; INUI, K.; AZUMA, Y.; NISHIMURA, N.; YAMANO, Y. (2000). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.82-B, n.7, p.1077-82, sept.

SOUZA, S.A. (1974). *Ensaio mecânicos de materiais metálicos*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

SPADARO, J.A.; ALBANESE, S.A. (1998). Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.24, n.4, p.567-73.

STENSTRÖM, M.; OLANDER, B.; LEHTO-AXTELIUS, D.; MADSEN, J.E.; NORDSLETTEN, L.; CARLSSON, G.A. (2000). Bone mineral density and bone structure parameters as predictors of bone strength: an analysis using computerized microtomography and gastrectomy-induced osteopenia in the rat. *Journal of Biomechanics*, v.33, p.289-97.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; KE, H.Z. (1995). FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, v.17, n.4, p.125S-33S, oct.

TURNER, R.T.; VANDERSTEENHOVEN, J.J.; BELL, N.H. (1987). The effects of ovariectomy and 17 β -estradiol on cortical histomorphometry in growing rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.2, p.115-22.

UHTHOFF, H.U.; JAWORSKI, Z.F.G. (1978). Bone loss in response to long-term immobilization. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.60B, n.3, aug.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Escola de Engenharia de São Carlos. Serviço de Biblioteca (2002). *Diretrizes para elaboração de dissertações e teses na EESC-USP*. 3.ed. São Carlos.

WANG, S.; LEWALLEN, D.G.; BOLANDER, M.E.; CHAO, E.Y.S.; ILSTRUP, D.M.; GREENLEAF, J.F. (1994). Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *Journal of Orthopaedic Research*, v.12, n.1, p.40-7.

WARDEN, S.J.; BENNELL, K.L.; MATTHEWS, B.; BROWN, D.J.; MCMEEKEN, J.M.; WARK, J.D. (2001a). Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. *Bone*, v.29, n.5, p.431-6, nov.

WARDEN, S.J.; BENNELL, K.L.; FORWOOD, M.R.; MCMEEKEN, J.M.; WARK, J.D. (2001b). Skeletal effects of low-intensity pulsed ultrasound on the ovariectomized rodent. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.27, n.7, p.989-98.

WELGUS, H.G.; JEFFREY, J.; EISEN, A.Z. (1981). Human skin fibroblast collagenase. Assessment of activation energy and deuterium isotope effect with collagenous substrates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 256, p.9516-21, sept.

WHO (1994). *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis*. WHO Technical Report Series, 843, World Health Organization, Geneva.

WRONSKI, T.J.; SCHENCK, P.A.; CINTRÓN, M.; WALSH, C.C. (1987). Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, v.40, p.155-9.

WRONSKI, T.J.; DANN, L.M.; SCOTT, K.S.; CINTRÓN, M. (1989). Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcified Tissue International*, v.45, p.360-6.

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

YOUNG, S. (1996). Terapia por ultra-som. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. *Eletroterapia de clayton*. 10.ed. São Paulo: Manole. Cap.15, p.235-58.

ANEXO A – Peso corporal (g) inicial dos animais, obtido no início do experimento, e final, obtido no dia do sacrifício.

Peso corporal dos animais do grupo intacto.

Animal	Peso inicial (g)	Peso final (g)
1	260	330
2	240	290
3	220	280
4	280	390
5	270	380
6	240	290
7	260	320
8	250	330
9	250	350

Peso corporal dos animais do grupo ovariectomizado.

Animal	Peso inicial (g)	Peso final (g)
1	240	320
2	260	370
3	260	350
4	240	310
5	260	330
6	280	460
7	220	340
8	250	400
9	240	340

Peso corporal dos animais do grupo tratado.

Animal	Peso inicial (g)	Peso final (g)
1	270	300
2	250	270
3	240	260
4	240	280
5	250	270
6	250	270
7	260	320
8	280	390
9	260	330
10	220	310

ANEXO B – Comprimento (mm) e peso (g) dos fêmures.

Comprimento e peso dos fêmures dos animais do grupo intacto.

Animal	Comprimento (mm)	Peso (g)
1 (E)	36,5	1,0143
1 (D)	36,7	1,0463
2 (E)	37,2	0,93
3 (E)	36,8	0,8943
3 (D)	36,7	0,843
4 (D)	37,5	1,0718
5 (E)	38,8	1,061
5 (D)	38,7	1,0764
6 (E)	38,2	1,1634
6 (D)	38,5	1,1262
7 (E)	36,6	0,9087
7 (D)	36,6	0,9184
8 (E)	36,6	0,9717
8 (D)	36,7	0,9693
9 (E)	36,9	0,9328
9 (D)	36,8	0,9379

(E) representa o fêmur esquerdo, (D) representa o fêmur direito.

Comprimento e peso dos fêmures dos animais do grupo ovariectomizado.

Animal	Comprimento (mm)	Peso (g)
1 (E)	36,9	1,0435
1 (D)	37,0	0,961
2 (E)	38,5	1,1831
3 (E)	38,3	1,1187
3 (D)	38,4	1,0526
4 (E)	35,7	0,9179
4 (D)	35,7	0,9159
5 (E)	36,5	0,85
5 (D)	36,5	0,81
6 (E)	38,3	1,0313
6 (D)	38,3	1,074
7 (E)	37,2	0,9941
7 (D)	37,4	1,018
8 (E)	37,9	1,0519
9 (D)	36,7	0,8831

(E) representa o fêmur esquerdo, (D) representa o fêmur direito.

Comprimento e peso dos fêmures dos animais do grupo tratado.

Animal	Comprimento (mm)	Peso (g)
1 (D)	36,6	0,8249
2 (E)	36,1	0,8039
3 (E)	36,0	0,8356
3 (D)	36,0	0,8255
4 (E)	36,2	0,8199
4 (D)	36,2	0,7951
5 (E)	37,0	0,8922
5 (D)	36,9	0,8982
6 (E)	36,8	0,9465
6 (D)	36,9	0,9365
7 (E)	37,1	1,0732
7 (D)	36,9	1,0697
8 (E)	38,0	1,1023
8 (D)	38,2	1,1490
9 (D)	36,1	1,0845
10 (E)	35,9	0,8377

(E) representa o fêmur esquerdo, (D) representa o fêmur direito.

ANEXO C – Carga e deformação do limite máximo dos fêmures dos animais.

Limite máximo dos fêmures dos animais do grupo intacto.

Animal	Limite máximo Carga (N)	Limite máximo Deformação ($\times 10^{-3}m$)
1 (E)	106,48	0,32
1 (D)	110,52	0,32
2 (E)	136,56	0,44
3 (E)	128,80	0,34
3 (D)	108,95	0,48
4 (D)	161,95	0,58
5 (E)	103,39	0,74
5 (D)	121,77	0,60
6 (E)	122,84	0,66
6 (D)	111,65	0,66
7 (E)	125,69	0,50
7 (D)	102,12	0,50
8 (E)	153,30	0,62
8 (D)	142,47	0,54
9 (E)	159,67	0,46
9 (D)	106,28	0,42

(E) representa o fêmur esquerdo, (D) representa o fêmur direito.

Limite máximo dos fêmures dos animais do grupo ovariectomizado.

Animal	Limite máximo Carga (N)	Limite máximo Deformação ($\times 10^{-3}m$)
1 (E)	111,75	0,40
1 (D)	88,05	0,58
2 (E)	114,56	0,54
3 (E)	85,85	0,62
3 (D)	110,74	0,48
4 (E)	95,33	0,56
4 (D)	88,62	0,52
5 (E)	112,85	0,52
5 (D)	116,87	0,50
6 (E)	111,99	0,52
6 (D)	114,42	0,40
7 (E)	109,20	0,46
7 (D)	118,90	0,60
8 (E)	112,82	0,58
9 (D)	104,54	0,40

(E) representa o fêmur esquerdo, (D) representa o fêmur direito.

Limite máximo dos fêmures dos animais do grupo tratado.

Animal	Limite máximo Carga (N)	Limite máximo Deformação ($\times 10^{-3}\text{m}$)
1 (D)	112,38	0,42
2 (E)	97,85	0,46
3 (E)	120,27	0,34
3 (D)	107,75	0,40
4 (E)	125,29	0,42
4 (D)	115,86	0,54
5 (E)	139,97	0,46
5 (D)	121,62	0,46
6 (E)	116,20	0,34
6 (D)	121,72	0,48
7 (E)	133,72	0,54
7 (D)	149,06	0,62
8 (E)	117,92	0,50
8 (D)	124,22	0,54
9 (D)	153,66	0,62
10 (E)	109,25	0,44

(E) representa o fêmur esquerdo, (D) representa o fêmur direito.