



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicabrasileira@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e
Traumatologia
Brasil

Massao Shimano, Marcos; Batista Volpon, José
Comportamento mecânico do terço proximal de fêmures de ratos após período de suspensão pela
cauda e exercitação
Acta Ortopédica Brasileira, vol. 15, núm. 5, 2007, pp. 254-257
Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65715504>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

COMPORTAMENTO MECÂNICO DO TERÇO PROXIMAL D FÊMURES DE RATOS APÓS PERÍODO DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E EXERCITAÇÃO

MECHANICAL BEHAVIOR OF RATS' FEMORAL PROXIMAL THIRDS AFTER A PERIOD OF TAIL SUSPENSION AND EXERCISES

MARCOS MASSAO SHIMANO¹, JOSÉ BATISTA VOLPON²

RESUMO

A remodelação óssea pode ser estimulada por forças mecânicas presentes nas atividades físicas normais. Neste trabalho foi analisado o comportamento mecânico do terço proximal de fêmur de ratas submetidas à suspensão pela cauda e posterior treinamento em esteira. Sessenta e seis ratas da raça Wistar foram usadas. Primeiramente os animais foram criados por noventa dias e divididos em cinco grupos (dois controles e três experimentais). Os animais do grupo Controle I foram sacrificados com 118 dias de idade. No grupo S (suspensão) os animais foram suspensos pela cauda por 28 dias e sacrificados. No grupo Controle II os animais foram sacrificados com 139 dias de idade. No grupo S-L (suspensão-liberado) as ratas foram liberadas 21 dias após a suspensão. No grupo S-T (suspensão-treinado) após o período de suspensão os animais passaram por treinamento em esteira durante 21 dias. Para análise do comportamento mecânico do osso foi aplicada uma força vertical na cabeça femoral até a ruptura. A fratura foi analisada por raios-X. A suspensão causou um decréscimo da força máxima e, o treinamento e a liberação após a suspensão causaram a recuperação das propriedades mecânicas. Mas, o padrão de fratura não apresentou diferença entre os grupos experimentais.

Descritores: Simulação de Ausência de Peso; Condicionamento Físico Animal; Biomecânica; Fêmur; Ratos.

SUMMARY

Bone remodeling can be stimulated by mechanical forces present in normal physical activities. In the present research, we investigated the mechanical behavior of the proximal femur of rats previously maintained in tail suspension and later, submitted to physical exercise on a treadmill. Sixty-six Wistar rats were used. First, animals were raised until the age of ninety days and then divided into five groups (two control groups and three experimental groups). The animals allocated to Control I group were killed at 118 days of age. In the S group, the animals were suspended by tail for 28 days. In Control II group, the animals were killed at 139 days of age. In group S-L (suspended and released) the rats were kept free for 21 days after tail suspension. In group S-T (suspended and trained) after tail suspension period, the rats were trained in a treadmill for 21 days. For analysis of the mechanical behavior of the bone, force was applied on the femoral head until failure. The fracture was evaluated by x-ray. Suspension caused a decrease of the maximum load. Treadmill training and post-suspension release caused the recovery of mechanical properties. But, the fracture line pattern did not show any difference among the experimental groups.

Keywords: Weightlessness Simulation; Physical Conditioning Animal; Biomechanics; Femur; Rats.

Citação: Shimano MM, Volpon JB. Comportamento mecânico do terço proximal de fêmures de ratos após período de suspensão pela cauda e exercitação. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2007; 15(5):254-257. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Shimano MM, Volpon JB. Mechanical behavior of rats' femoral proximal thirds after a period of tail suspension and exercises. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2007; 15(5):254-257. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Segundo Bikle et al.⁽¹⁾, a osteogênese pode ser estimulada por pequenas deformações na arquitetura óssea, provocadas por forças mecânicas aplicadas durante a atividade física normal, que pode atuar diretamente na taxa de remodelamento ósseo. Já, a hipocinesia (diminuição das atividades) leva a um processo de diminuição desta taxa⁽²⁾. Portanto, um ambiente ou situação com menor quantidade de estímulos mecânicos produz modificações na estrutura óssea. Exemplos desta situação são observados em viagens espaciais (exposição de astronautas ao ambiente de menor força gravitacional), imobilizações ortopédicas e a permanência prolongada de pacientes no leito que, segundo Holick⁽³⁾, podem causar perdas significativas da densidade mineral e da massa óssea. Nestes casos, o esqueleto não necessita de toda sua massa óssea para manter a integridade estrutural, e desenvolve a osteopenia, que poderá levar a fraturas ósseas, após o retorno às atividades físicas normais⁽⁴⁾.

Durante os vôos espaciais, que duram mais de um mês, os astronautas são submetidos a perdas significativas da massa óssea e da densidade mineral óssea nas partes do esqueleto que suportam o peso corporal, principalmente a coluna vertebral e os membros inferiores. Estudos mostraram que estas perdas são consequências do sub-carregamento do peso observado no ambiente de menor força gravitacional^(3,5).

A idéia de utilizar a suspensão dos membros posteriores de ratos para estudar as consequências do descarregamento e ulterior regeneramento ocorridos durante e após vôos espaciais, teve início na década de 70 pela *National Aeronautics and Space Administration (NASA)-Ames Research Center*.

Em 1987, Wronski e Morey-Holton⁽⁶⁾ compararam a suspensão pelo quadril e a suspensão pela cauda, em ratos. Concluíram que a resposta do sistema esquelético varia de acordo com o método de suspensão. O modelo que mais se aproximou dos efeitos provocados pela menor gravidade foi a suspensão pela cauda, sendo também, o que menos causou problemas com o sistema de fixação.

O descarregamento dos membros posteriores de ratos, com suspensão pela cauda, é um modelo aceito pela comunidade científica para simular os efeitos de vôos espaciais. O protocolo de operação padrão para descarregamento com aplicação em ratos jovens e adultos foi atualizado e aprovado pela *National Aeronautics and Space Administration (NASA), Ames Research Center (ARC), Institutional Animal Care and Use Committee* em Agosto de 2001⁽⁷⁾.

Apesar das sérias implicações da perda de massa óssea, consequentemente, a pré-disponibilidade do esqueleto humano à fratura no retorno às atividades normais, ainda não existe uma contramedida estabelecida que mantenha a integridade do

durante longos períodos de sub-carregamento do peso sobre a estrutura óssea⁽⁸⁾. O exercício físico é a contramedida mais estudada para amenizar ou prevenir a atrofia muscular e a perda de massa óssea. Estudos em animais com treinamento em esteiras relataram que houve aumento da massa óssea^(9,10). O quadril é uma articulação muito importante e está envolvido diretamente nos problemas relacionados à perda de massa óssea, pois, é um dos locais com maior índice de fraturas⁽¹¹⁾. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o terço proximal de fêmures de ratos quando submetidos à suspensão pela cauda e posterior treinamento em esteira, por meio de ensaio mecânico e radiografia.

MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 038/2003). Ratas matrizes da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), prenhes e na fase final de gestação, foram separadas e, após a parturição, foram selecionados seis filhotes fêmeas para cada rata mãe e os demais desprezados. As ratas mães permaneceram em gaiolas individuais, juntamente com os filhotes até a idade do desmame (21 dias).

Aos 90 dias de idade, os animais foram divididos nos seguintes grupos: -Grupo Controle-I (CONT-I) – os animais foram criados e observados até 118 dias de idade; -Grupo Suspenso (S) – os animais foram suspensos pela cauda durante 28 dias e, portanto, sacrificados aos 118 dias de idade; -Grupo Controle II (CONT-II) – os animais foram mantidos até 139 dias de idade; -Grupo Suspenso-liberado (S-L) – os animais ficaram em suspensão pela cauda durante 28 dias e, depois liberados nas gaiolas por mais 21 dias. O sacrifício ocorreu em seguida, aos 139 dias de idade; -Grupo Suspenso-treinado (S-T) – os animais ficaram em suspensão pela cauda por 28 dias e, depois, foram exercitados em esteira e sacrificados a seguir, aos 139 dias de idade.

Suspensão do animal

Os animais dos grupos S, S-L e S-T foram suspensos pela cauda durante 28 dias e, todos os procedimentos para suspensão do animal pela cauda foram baseados no trabalho de Silva e Volpon⁽¹²⁾, que utilizaram um modelo de suspensão elaborado a partir do descrito por Kasper et al.⁽¹³⁾.

Para a preparação da cauda do animal para suspensão, os ratos foram anestesiados com uma aplicação intramuscular da combinação de ketamina e xilazina na proporção de 30mg/kg e 3mg/kg, respectivamente. Sob anestesia, a cauda do animal foi lavada e aplicada tintura de benjoim em toda a pele. Em seguida, a cauda foi envolvida com espuma adesiva (Reston®), desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger a pele. Sobre a espuma foi aplicada uma bandagem elástica Coban® - modelo 1582 da marca 3M®, tensionada homogeneamente, de modo a envolver toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocado um cordão estreito fixado por enfaixamentos adicionais, de modo a formar uma alça que serviu para prender o animal ao sistema de suspensão, por meio de uma presilha. Com o animal ainda anestesiado, a extremidade distal da cauda não enfaixada foi amputada, para evitar necrose. Após os procedimentos de preparação da cauda foi aplicado ketoprofeno intramuscular no membro posterior (analgésico e antiinflamatório) na dose de 3,5mg/kg. Esta aplicação foi repetida uma vez ao dia, por três dias consecutivos.

O sistema de suspensão foi composto por uma gaiola de duas partes e um sistema de fixação do animal. A parte inferior da gaiola foi formada por uma caixa de acrílico transparente para permitir a visualização e controle do animal, aberta superiormente. Sobre essa caixa foi colocada uma gaiola de grade metálica na posição invertida, com encaixes nas laterais para garantir a fixação com a caixa de acrílico. O sistema de fixação do animal foi encaixado na parte superior da gaiola e foi composto por uma presilha, um

da suspensão foi ajustada para que o animal pudesse apoiar membros anteriores no solo (Figura 1).

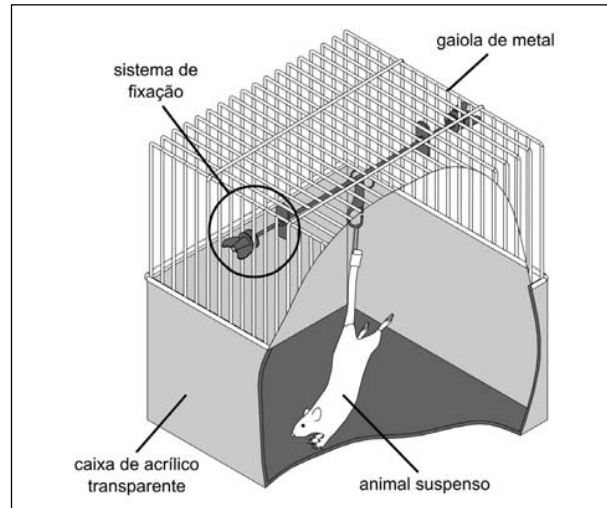


Figura 1 - Desenho esquemático do animal suspenso pela cauda na gaiola.

Treinamento

O treinamento foi realizado em uma esteira motorizada, composta por seis baias individuais, com altura de 15,0cm, largura interna de 10,0cm e comprimento de 50,0cm. Para a execução dos ratos na esteira foi seguido o protocolo utilizado por Norman et al.⁽⁸⁾. O período de treinamento foi iniciado no dia seguinte ao término da suspensão, com 10 minutos. Foram acrescentados cinco minutos por dia até chegar aos 60 minutos de treinamento diários. A velocidade média da esteira foi de 17m/min na posição horizontal. Os animais foram submetidos a este protocolo por 3 dias consecutivos, seguidos por um dia sem treinamento (descanso/recuperação).

Análise mecânica

Após o período de experimento, os animais foram pesados e depois foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental. O fêmur esquerdo foi retirado, limpo das partes moles, pesado e identificado para, então, ser envolvido em gaze umedecida com solução fisiológica e conservado a -20°C.

Doze horas antes do início dos processos de preparação para a realização do ensaio mecânico, os ossos foram retirados da temperatura de -20°C e mantidos em geladeira com temperatura média de 1°C e, duas horas antes, foram mantidos em temperatura ambiente que variou entre 25°C e 27°C, para entrar em equilíbrio térmico com o meio ambiente. Para a realização dos ensaios foi necessária a inclusão em acrílico da extremidade distal dos fêmures para a fixação na posição vertical.

Para isso foi elaborado e confeccionado um acessório metálico para a inclusão em acrílico de até seis fêmures (Figura 2). O acessório foi confeccionado em latão e alumínio. Antes de iniciar os procedimentos de inclusão, o acessório foi untado com óleo mineral para evitar aderência do acrílico no metal.

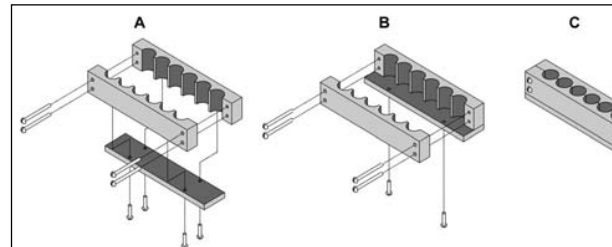


Figura 2 - Desenho esquemático do acessório confeccionado para a inclusão da porção distal dos fêmures dos ratos em acrílico. (A) Acessório desmontado, (B) Acessório montado com fêmures inseridos, (C) Detalhe da fixação dos fêmures no acessório.



Os fêmures foram colados na base com cola epóxi (5 minutos) e presos com elásticos para mantê-los na posição vertical até a cura da cola. Após, os elásticos foram cortados e o acessório foi fechado para o recebimento do acrílico. Foi utilizado o acrílico autopolimerizante JET-Clássico® na proporção volumétrica de 2,0ml de pó para 1,0ml de solvente, os componentes foram misturados e vazados no acessório. A polimerização completa ocorreu em aproximadamente seis minutos e, durante todo o processo, o conjunto foi refrigerado em um recipiente com água gelada, além de manter umedecida a parte exposta do fêmur. Após a polimerização completa do acrílico, o acessório foi aberto e o conjunto acrílico-osso foi retirado.

Ensaio mecânico

Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaio EMIC®-10000N. Para a obtenção das forças exercidas foi usada uma célula de carga com capacidade máxima de 50kgf e as deformações foram captadas pelos sensores internos de deslocamento da máquina.

O conjunto acrílico-osso foi preso em uma morsa acoplada à base da máquina universal de ensaio. Foi aplicada uma força vertical com um acessório de 2 mm de diâmetro na cabeça femoral até que houvesse fratura. A velocidade de aplicação da força foi de 0,1mm/min (Figura 3).

Destes ensaios foram obtidos gráficos força x deformação de onde foi possível obter como propriedades mecânicas a rigidez e a força máxima.

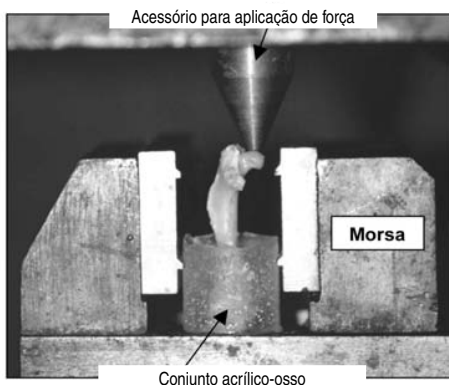
Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SigmaStat® v.2.03. Inicialmente à aplicação dos testes estatísticos, foram realizadas análises de normalidade e de igualdade de variância. Para realizar a comparação dos grupos CONT-I x CONT-II e dos grupos CONT-I x S foi utilizado o teste *t* de Student. Outra comparação realizada foi entre os grupos CONT-II x S-L x S-T, neste caso foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA de uma via (One Way Analysis of Variance) para dados paramétricos. Em todas as análises foi usado o valor de 5% como nível de significância.

Análise radiográfica

Após a realização dos ensaios mecânicos, o conjunto acrílico-osso foi radiografado por um equipamento de radiografia odontológica, na incidência ântero-posterior com tempo de exposição de 0,15 segundo. A tensão nominal máxima do equipamento foi de 70kVp e a corrente nominal máxima de 10mA. Foi utilizado filme radiográfico periapical – oclusal – M2 (5cm x 7cm). A distância entre o foco radiográfico e o filme foi de 5cm.

Para revelação do filme radiográfico foram utilizados os procedimentos de rotina, com o cuidado para que todos os filmes ficassem o mesmo tempo no revelador e no fixador. As radiografias foram digitalizadas com 1200 dpi de resolução. A imagem do terço proximal do fêmur foi ampliada e a fratura analisada quanto ao traço.



RESULTADOS

Para os resultados finais foram considerados todos os animais que não apresentaram problemas durante os procedimentos experimentais. Estes problemas foram: peso muito abaixo da média do grupo S e um do grupo S-L; morte por causa desconhecida de um animal do grupo CONT-I; ruptura da cauda durante a suspensão (três animais do grupo S, dois do grupo S-L e um do grupo S-T); perda excessiva de peso durante os procedimentos (um animal do grupo S-L) e dois animais do grupo S-T não conseguiram adaptar ao protocolo de treinamento. Além disso, dois resultados foram desprezados (um do grupo S-L e um do grupo S-T) por apresentarem comportamento mecânico muito diferente em relação aos outros espécimes. Portanto, foram considerados para análises 10 (dez) animais do grupo CONT-I, 10 (dez) animais do grupo S, 12 (doze) animais do grupo CONT-II, 9 (nove) animais do grupo S-L e 10 (dez) animais do grupo S-T.

Ao comparar os dois grupos controle (CONT-I e CONT-II) não foram detectadas diferenças significativas nos valores da rigidez e da força máxima. Na comparação entre o grupo CONT-I e o grupo S a diferença significativa foi apenas na força máxima e na comparação entre os outros três grupos, não foi detectada diferença estatística (Tabela 1).

	Grupos				
	CONT-I	S	CONT-II	S-L	S-T
Rigidez (x10 ³ N/m)	209,4 ±64,5	189,8 ±66,3	287,2 ±77,1*	269,1 ±46,7	279,1 ±62,1
Força máxima (N)	101,5 ±10,5	86,3 ±13,5*	115,0 ±12,6*	104,9 ±12,9	115,0 ±15,0

*diferença estatística com o grupo CONT-I

Tabela 1 - Média ± desvio padrão das propriedades mecânicas obtidas nos ensaios realizados no terço proximal do fêmur esquerdo dos animais.

O padrão de fratura observado das radiografias foi semelhante em todos os grupos e, basicamente, constituído por um traço que se iniciou no terço lateral do topo da cabeça e seguiu em uma direção verticalizada no sentido do colo femoral. Em algumas radiografias, o traço foi bem visível e acompanhado de um pequeno desvio dos fragmentos. Em outras, ele era pouco visível, mas em caso algum houve separação completa dos fragmentos (Figura 4).

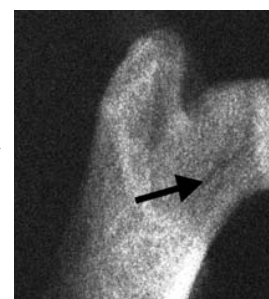


Figura 4 - Detalhe de uma radiografia obtida após o ensaio de compressão no terço proximal do fêmur esquerdo, mostrando a fratura (seta).

DISCUSSÃO

Durante os vôos espaciais que duram mais de um mês os astronautas são submetidos a perdas significativas da massa óssea, da densidade mineral óssea nas principais partes do esqueleto que suportam o peso corporal, principalmente a coluna vertebral e os membros inferiores⁽²⁾. Estudos mostraram que estas perdas são conseqüências do sub-carregamento do peso observado no ambiente de menor gravidade^(3,14).

O decréscimo da massa óssea pode provocar aumento no risco de fraturas, não durante o período de sub-carregamento, mas no retorno às atividades físicas normais. Portanto, é fundamental conhecer o comportamento mecânico das principais estruturas esqueléticas responsáveis pela sustentação do peso corporal, após o período de hipocinesia. Daí surgiu o interesse em analisar mecanicamente os ossos de animais que tiveram seus membros posteriores



O rato foi escolhido como animal experimental pela facilidade em mantê-lo em laboratório, baixo custo e, principalmente pela possibilidade de simular o sub-carregamento.

A suspensão por 28 dias foi baseada em trabalhos realizados com animais suspensos pelo mesmo período; nestes casos, o tempo foi suficiente para causar alterações significativas na estrutura óssea⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

A cauda foi totalmente amputada após a suspensão, devido às lesões graves causadas pelo sistema de fixação da cauda. Morey-Holton e Globus⁽⁷⁾ e mais recentemente Knox et al.⁽¹⁸⁾ apresentaram diferentes sistemas de fixação da cauda para suspensão do rato, todos com o objetivo de minimizar a compressão da cauda pelas faixas. Portanto, danos à cauda do animal ainda são problemas, embora poucos trabalhos o tenham relatado. Para os próximos estudos, seria importante testar os novos sistemas de fixação, na tentativa de evitar danos à cauda.

Existem vários estudos com diferentes protocolos de exercício em esteira, mas foi seguido o protocolo utilizado por Norman et al.⁽⁶⁾ porque estes autores treinaram ratos em esteira após ficarem suspensos pela cauda por 21 dias. E, segundo eles, o dia de descanso dos animais foi importante para recuperação e evitar danos relacionados ao excesso de treinamento.

O método convencional para testar mecanicamente o terço proximal do fêmur de ratos é baseado na aplicação de uma força axial na cabeça do fêmur, entretanto, em ossos osteoporóticos, a maioria das fraturas neste local é resultado de momentos fletores elevados, gerados por forças laterais ou forças torcionais⁽¹⁹⁾. Neste trabalho foi escolhido o método convencional por não requerer acessórios especiais, pelos resultados satisfatórios e também, por estar a metodologia de ensaio bem definida. O maior problema observado neste tipo de ensaio foi o alinhamento dos fêmures durante a inclusão, mas, em trabalhos que utilizaram o mesmo tipo de ensaio^(9,17,19), os autores não desprezaram como realizaram o alinhamento do fêmur.

A utilização do acessório para inclusão otimizou o processo, visto que em outros trabalhos as inclusões foram feitas individualmente, o que demanda mais tempo. Portanto, foi possível realizar os ensaios mecânicos no mesmo dia da inclusão, sem necessidade de novo congelamento.

Macroscopicamente, após a realização dos ensaios foi observado o esmagamento da cabeça femoral no local da aplicação da força, confirmando o que foi descrito por Bloomfield et al.⁽¹⁷⁾. Portanto, de acordo com estes autores, a propriedade mecânica que melhor representou o comportamento da região ensaiada foi a força máxima.

Outro ponto a ser comentado é que, neste caso, a estrutura ensaiada é formada por osso cortical preenchida com osso trabecular, ou seja, não é homogênea, o que dificulta a interpretação dos resultados. Além disso, nesta parte do fêmur o formato é muito complexo e causa distribuição irregular das forças.

Comparando os grupos CONT-I e CONT-II foram verificadas diferenças significativas na rigidez e na força máxima, portanto foram realizadas comparações entre o grupo S (suspensão) e grupos S-L (suspensão-liberado) e S-T (suspensão-treinado).

Ao comparar o grupo CONT-I com o grupo S foi observada diferença significativa da força máxima, o que mostra que a suspensão por 28 dias provocou alterações estruturais, o que também foi encontrado por Bloomfield et al.⁽¹⁷⁾.

Na comparação das propriedades analisadas não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos CONT-II, S-L e S-T. Portanto, a simples liberação (grupo S-L) promoveu a recuperação da força máxima da mesma forma que o treinamento.

Nas radiografias não foi observada diferença alguma nos pontos de fraturas, provavelmente porque as alterações provocadas pela suspensão, suspensão-liberação e suspensão-treinamento foram suficientes para alterá-la, mas, a aplicação de uma força diferente (lateral ou torcional) poderia gerar outros tipos de fraturas e até um comportamento mecânico diferente.

As diferenças das propriedades mecânicas entre o grupo CONT-I e o grupo CONT-II sugerem, de acordo com o trabalho de Bloomfield et al.⁽²⁰⁾, que existam diferenças na composição microestrutural dos ossos de animais de diferentes faixas etárias. Portanto, não foi possível fazer comparação entre o grupo S (suspensão) com os grupos S-L (suspensão-liberado) e S-T (suspensão-treinado).

Para os próximos trabalhos, a realização do controle radiográfico antes dos ensaios, possibilitaria identificar alterações geométricas que tenham ocorrido na região do terço proximal do fêmur (deformação do colo femoral e achatamento da cabeça femoral). Portanto, as alterações poderão ocorrer como uma adaptação às diferentes cargas impostas durante o retorno às atividades normais (liberação) ou durante o treinamento.

Deste trabalho, fica evidente a necessidade de novos estudos para obter resultados que, somados aos aqui obtidos, levarão à melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem nos tecidos ósseos, que não deixam de ser solicitados mecanicamente e re-solicitados.

CONCLUSÃO

Nossos achados indicaram que o sub-carregamento dos membros posteriores de ratos, provocou danos significativos na força máxima suportada pelo terço proximal do fêmur, e o retorno às atividades com ou sem treinamento, recuperou o comportamento mecânico da região.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro para aquisição da esteira e outros equipamentos. E à CAPES, Comissão de Auxílio à Pesquisa do Ensino Superior, pelo apoio e concessão de bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal unloading on bone formation. *Gravit Space Biol Bull.* 2003; 16:45-54.
2. Turner RT. Physiology of a microgravity environment. Invited Review: What do we know about the effects of spaceflight on bone? *J Appl Physiol.* 2000; 89:840-7.
3. Holick MF. Perspective on the impact of weightlessness on calcium and bone metabolism. *Bone.* 1998; 22:105-11.
4. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone.* 1998; 22:83-8.
5. Vico L, Lafage-Proust M-H, Alexandre C. Effects of gravitational on the bone system in vitro and in vivo. *Bone.* 1998; 22:95S-100S.
6. Wronski TJ, Morey-Holton ER. Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques. *Aviat Space Environ Med.* 1987; 58:63-8.
7. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol.* 2002; 92:1367-77.
8. Norman TL, Bradley-Popovich G, Clovis N, Cutlip G, Bryner RW. Aerobic Exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. *Aviat Space Environ Med.* 2000; 71:593-8.
9. Tuukkanen J, Peng Z, Väänänen HK. Effect of running exercise on the bone loss induced by orchidectomy in the rats. *Calcif Tissue Int.* 1994; 55:33-7.
10. Mathey J, Horcajada-Molteni M-N, Chanteranne B, Picherit C, Puel C, Leboucq P, et al. Bone mass in obese diabetic Zucker rats: influence of treadmill
12. Silva AV, Volpon JB. Modelo de simulação de microgravidade e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. *Acta Ortop Bras.* 2002; 10:22-31.
13. Kasper CE, McNulty AL, Otto AJ, Thomas DP. Alterations in skeletal muscle mass related to impaired physical mobility: an empirical model. *Res Nurs Health.* 2000; 23:16-26.
14. LeBlanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:543-50.
15. Collier PN, Wilkerson MK, Bloomfield SA, Suva LJ, Turner RT, Delp MD. Effects on skeletal perfusion with simulated microgravity: a possible mechanism for bone remodeling. *J Appl Physiol.* 2000; 89:1046-54.
16. Garber MA, McDowell DL, Hutton WC. Bone loss during simulated weightlessness: a biomechanical and mineralization study in the rat model. *Aviat Space Environ Med.* 2000; 71:586-92.
17. Bloomfield SA, Allen MR, Hogan HA, Delp MD. Site and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. *Bone.* 2002; 31:149-54.
18. Knox M, Fluckey JD, Bennett P, Peterson CA, Dupont-Versteegden EM. Hindlimb unloading in adult rats using an alternative tail harness design. *Aviat Space Environ Med.* 2004; 75:692-6.
19. Zhang G, Qin L, Shi Y, Leung K. A comparative study between axial compression and lateral flexion configuration tested in rat proximal femur model. *Orthop Res.* 2005; 23:104-11.