

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITO DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE FÊMUR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Lucélia Maria Albertin

São Carlos

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITO DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE FÊMUR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Lucélia Maria Albertin

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka

São Carlos

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A334eu

Albertin, Lucélia Maria.

Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre
fêmur de ratas ovariectomizadas / Lucélia Maria Albertin. --
São Carlos : UFSCar, 2007.
95 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2007.


1. Osteoporose. 2. Osso. 3. Medicina experimental – rato.
4. Ultra-som. I. Título.

CDD: 616.716 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de Lucélia Maria Albertin

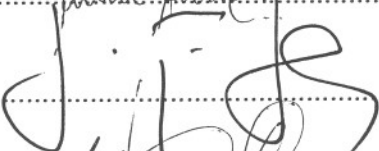
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka



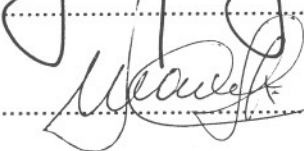
Prof. Dr. Marcos Massao Shimano



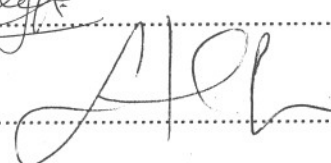
Prof. Dr. José Marcos Alves



Profa. Dra. Maria do Carmo Sitta



Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa



Orientadora

Profª Drª Keico Okino Nonaka

Aos meus pais, Mario e Luzia, pelo exemplo de amor e dedicação

A minha irmã Lúcia (Shany) pelo amor incondicional.

*A minha irmã Léo e aos meus sobrinhos, Fabiano,
Ana Paula, Thiago, pela compreensão e apoio constantes.*

“O grande erro das criaturas humanas foi entronizar apenas a inteligência, olvidando os valores legítimos do coração nos caminhos da vida”. (Emmanuel)

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta chance de vida para aprender e evoluir.

A Profª Drª Keico Okino Nonaka pela oportunidade e contribuição para o meu desenvolvimento científico e espiritual.

Ao Prof. Dr. Luiz Romariz Duarte, USP, pelos ensinamentos e apoio que ainda hoje se fazem presentes.

À Profª Drª Vanda Jorgetti, que muito mais que pela oportunidade de realizar a histomorfometria, pela amizade e carinho tão explicitamente demonstrados.

Aos amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Nina, Lidi, Patrícia, Dernival, Adriana, Charles, Valéria, Fernando Talhari, pelo apoio e ajuda incansável.

Ao Sr. Sergio Dias, técnico do Laboratório de Neuroendocrinologia pela extrema disponibilidade e compreensão.

À Selma e Carmem pelas informações burocráticas e regimentais tão prontamente fornecidas. As nossas “escragiárias”, Paula e Michelli, pela amizade, colaboração e por suportar momentos de desgastes emocionais. Muito obrigada pelo companheirismo e carinho.

Aos amigos Laila, Eli, Kátia, Cléo, André, Fabinho, Fernando (Foguinho), Juciléia, Daniel, Zezinho, Fábio pelo carinho e amizade, indispensáveis na realização deste trabalho.

À amiga Diana pela amizade, carinho, compreensão e principalmente pelas solidariedade e paciência.

À Profª Drª Ana Lúcia Kalinin, UFSCar, pelo carinho e amizade acima de tudo.

Aos Professores Doutores Tânia de Fátima Salvini, Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo UFSCar, Cleópatra da Silva Planeta – UNESP (Araraquara), José Baptista Volpon e José Marcos Alves - Bioengenharia - USP pela colaboração e incentivos.

Ao amigo Marcos Massao Shimano pela valorosa ajuda na biomecânica e elaboração dos corpos de prova, também pelo incentivo e apoio na hora certa.

Aos meus pais, mesmo não presentes fisicamente, apoiaram e incentivaram o meu espírito que muitas vezes se abateu pelo desânimo e descrença.

Ao Fred, que mesmo não entendendo o que lhe era dito, me ouvia pacientemente.

Enfim, meu muito obrigada a todos com quem eu pude contar e que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Este trabalho recebeu auxílio financeiro do CNPq
através da concessão de bolsa de estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do corte de um osso longo (fêmur).....	20
Figura 2 - Representação da curva carga <i>versus</i> deformação.....	40
Figura 3 - Representação esquemática da onda de ultra-som.....	50
Figura 4 - Animal no tubo de contenção e aparelho de ultra-som.....	50
Figura 5 - Foto da estimulação.....	51
Figura 6 - Máquina de ensaio universal (Instron 4444) durante o ensaio de compressão da cabeça do fêmur.....	53
Figura 7 - Detalhe do ensaio de compressão da cabeça do fêmur.....	54
Figura 8 - Foto do fêmur para a retirada da cabeça.....	54
Figura 9 - Peso corporal inicial e final.....	61
Figura 10 - Ganho de peso corporal.....	61
Figura 11 - Parâmetros físicos da cabeça do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	64
Figura 12 - Parâmetros biomecânicos da cabeça do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	65
Figura 13 - Parâmetros histomorfométricos do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais	67

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Peso Corporal Inicial e Final e Ganho de Peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	60
Tabela 2 – Parâmetros Físicos da Cabeça do Fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	62
Tabela 3 – Parâmetros Físicos da Cabeça do Fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	62
Tabela 4 – Parâmetros Biomecânicos da Cabeça do Fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	63
Tabela 5 – Parâmetros Histomorfométricos da Região Distal do Fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amplitude
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ARF	Ativação-Reabsorção-Formação
BMC	Conteúdo Mineral Ósseo
BMD	Densidade Mineral Óssea
BRU	Unidade de Remodelação Óssea
BV/TV	Volume Ósseo
C	Velocidade
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
EPM	Erro Padrão da Média
f	Frequência
FDA	Food and Drugs Administration
Fig	Figura
HRT	Terapia de Reposição Hormonal
Hz	Hertz – unidade de medida de frequência
I	Intensidade
INTA	Intacto
J	Joule
KHz	Kilohertz – medida de frequência
MHz	Megahertz – medida de frequência
MPa	Megapascal
ms	milisegundo
mW	miliwatts
n	número de animais

NBR	Normas Brasileiras
NO	Óxido Nítrico
OVX	Ovariectomia
P	Peso Cinzas
PC	Peso Corporal
Pi	Peso imerso
Ps	Peso Seco
PTH	Paratormônio
Pu	Peso Úmido
PZT	Titanato Zirconato de Chumbo
SATA	Spatial Average Temporal Average
SD	Desvio Padrão
SGPs	Potenciais Gerados por Deformação
Sh	Sham
T	Período
Tb.N	Número de Trabéculas
TbSp	Separação Trabecular
TbTh	Espessura Trabecular
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
US	Ultra-som
USP	Universidade de São Paulo
UST	Ultra-som Terapêutico
VO	Volume Ósseo
vs	versus
W	Watts

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O tecido Ósseo.....	18
1.2 A Osteoporose.....	21
1.3 O Tratamento.....	24
1.4 O Ultra-som.....	27
1.5 O Modelo Experimental de Osteoporose Humana.....	37
1.6 Método de Análise da Qualidade Óssea.....	38
1.7 Utilização das Propriedades Biomecânicas.....	39
1.8 Histolomorfometria Óssea.....	44
2 OBJETIVOS.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Os animais.....	48
3.2 A Ovariectomia.....	48
3.3 Protocolo Exeperimental.....	48
3.4 O Tratamento.....	49
3.5 Variáveis Estudadas.....	52
3.5.1 Peso Corporal.....	52
3.5.2 Propriedades Biomecânicas do Fêmur.....	52
3.5.3 Propriedades Físicas do Fêmur.....	55
3.5.4 Análise Histomorfométrica.....	56
3.6 Análise Estatística.....	58
3.7 Norma Metodológica.....	59

4 RESULTADOS.....	60
4.1 A Ovariectomia.....	60
4.2 Peso Corporal.....	60
4.3 Parâmetros Físicos.....	62
4.4 Parâmetros Biomecânicos.....	63
4.5 Parâmetros Histomorfométricos.....	66
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RESUMO

A osteoporose é uma doença metabólica que se caracteriza pelo comprometimento da resistência óssea, conseqüência da integração de dois fatores: a densidade óssea expressa pela quantidade de material mineral por área ou volume ósseo e a qualidade óssea relativa a arquitetura, remodelamento e mineralização óssea com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas. As fraturas osteoporóticas são freqüentes no punho, na coluna tóraco-lombar e no fêmur, isto é, em áreas do esqueleto com predomínio de osso trabecular. Elas determinam grande morbidade e mortalidade, com repercussões sócio-econômicas, sendo assim um grande problema de saúde pública. Estudos têm sido elaborados propondo tratamentos alternativos, não farmacológicos, dentre eles o ultra-som pulsado de baixa intensidade que já tem estabelecido seu efeito osteogênico, como estímulo mecânico, em células isoladas e fraturas ósseas. Porém, em osteoporose estes efeitos não estão totalmente esclarecidos, como também são escassos os estudos com o objetivo de evitar a osteopenia através de estímulos mecânicos tais como o ultra-som. Para tanto, o presente estudo teve como objetivo analisar a atuação do ultra-som pulsado de baixa intensidade (30mw/cm^2 - SATA, largura de pulso de $200\mu\text{s}$, freqüência de repetição e $1,0\text{ KHz}$ e freqüência de $1,5\text{ MHz}$) em fêmur de ratas Wistar ovariectomizadas (OVX), utilizadas como modelo de osteoporose experimental, através da análise de parâmetros biomecânicos, físicos e histomorfométricos. O tratamento iniciou 24 h após a ovariectomia por 5 dias/semana com a duração de 30 e 20 minutos durante 8 semanas. Ratas Wistar com 4 meses de idade foram divididas em 6 grupos experimentais: Grupos US 30 e US 20 – ratas OVX que receberam estimulação ultrassônica durante 30 e 20min. respectivamente; Grupo Sham 30 e Sham 20 – ratas OVX estimuladas por 30 e 20 min. respectivamente porém, com o aparelho de ultra-som desligado; Grupo Intacto 30 e Intacto 20 – ratas não ovariectomizadas, estimuladas por 30 e 20 min respectivamente, com o aparelho de ultra-som desligado. A eficácia do modelo de osteopenia induzida pela ovariectomia ficou demonstrada através da análise das propriedades biomecânicas, físicas e histomorfométricas. Esta investigação evidenciou também a não atuação do ultra-som pulsado de baixa intensidade evitando mudanças da microarquitetura dos ossos osteopênicos.

Palavras-chaves: Osso, Osteoporose, Osteopenia, Ultra-som, Rato.

ABSTRACT

Osteoporosis is a metabolic disease characterized by the damage of the bone strength due to the integration of bone density, expressed by the quantity of mineral material by bone area and volume, and the bone quality related to bone architecture, remodeling and mineralization. It is a disease that induces bone fragility and fracture spinal column and in the femur, where trabecular bone are predominant. The osteoporotic fractures are responsible by great morbidity and mortality, therefore representing a great public health problem. Studies with alternative non pharmacological treatments have been proposed and one of them is the pulsed ultrasound with low intensity (US). It is well known its osteogenic effect as a mechanical stimulus in isolates cells and bone fractures. However, these effects are not completely explained in the osteoporosis. Also, studies with aim to avoid the osteopenia with mechanical stimulus as US are rare. Therefore, the present study had the objective to analyze the effect of US (30 mw/cm² – SATA, 200µs pulse width, 1 KHz of frequency of repetition and frequency of 1.5 MHz) in femur of rats. The ovariectomized Wistar rats were used as animal model of experimental osteoporosis. Biomechanical, physical and histomorphometric parameters were analyzed. The treatment began 24h after ovariectomy, 5 days/week, during 8 weeks. Female rats with 4 months of age were divides in 6 experimental groups: US 30 and US 20 - OVX rats US stimulated during 30 and 20 minutes; Sham 30 and Sham 20 – OVX rats US sham stimulated; Intact 30 and Intact20 – intact rats US sham stimulated. The efficacy of the osteopenia model induced by ovariectomy was demonstrated by the physical, biomechanical and histomorphometric parameters. These parameters also showed that US was not efficiency to avoid the bone microarchitetur deterioration induced by castration.

Key words: Bone, Osteoporosis, Osteopenia, Ultrasound, Rat.

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é definida como doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura (WHO, 1994). Por ser uma doença incapacitante, origina um grande problema de Saúde Pública, com altos índices de morbidade e mortalidade, devido principalmente a fraturas, podendo levar a problemas conseqüentes como infecções generalizadas, pneumonias, trombozes venosas e embolias dentre outros.

No Brasil a osteoporose acomete de 25% a 30% das mulheres na pós-menopausa e 40% a 60% das pessoas com mais de 60 anos (CARNEIRO, 2001).

Estudos apontam que em 2050, 15% da população mundial serão de idosos, portanto com maior possibilidade de incidências de osteoporose. No Brasil a incidência de fraturas decorrentes da osteoporose deve alcançar o índice de 600.000 fraturas por ano, sendo 400.000 de vértebras e 200.000 femurais (CHAIMOWICZ, 1997; CARNEIRO, 2000).

Devido a esta previsão alarmante, têm-se proposto novos mecanismos de identificação e tratamentos precoces na tentativa de prevenir, estabilizar ou minimizar os efeitos da osteoporose.

Tratamentos convencionais, quase que exclusivamente farmacológicos, têm como objetivo impedir o progresso da patologia. Também, o tratamento com métodos não farmacológicos ou associados têm sido propostos tentando impedir a perda de massa óssea. Um destes métodos é a utilização do ultra-som (US) pulsado de baixa intensidade, já que o osso, sendo um tecido dinâmico com propriedades de remodelamento, responde a estímulos mecânicos. Devido à sua propriedade piezoelétrica, microdeformações decorrentes de cargas mecânicas geram no osso cargas elétricas que agirão sobre a resposta óssea, a osteogênese. O US tem ainda a possibilidade de ser usado de modo não invasivo em regiões específicas do esqueleto causando um efeito mecânico local. Isto faz com que o método seja preferível por

evitar, muitas vezes, os efeitos indesejáveis de não tolerância e efeitos colaterais dos tratamentos farmacológicos.

O US são ondas de energia acústica inaudíveis de alta frequência que se propagam sob a forma de ondas mecânicas (CHIVERS, 1991; WARDEN *et al*, 2001a), cuja energia é transmitida pelo movimento de partículas do meio em que são irradiadas.

O ultra-som de baixa intensidade evidenciou sua eficácia em estudos sobre aceleração do processo de consolidação de fraturas ósseas experimentais (DUARTE, 1977; DUARTE, 1983; KRISTIENSEN *et al*, 1997; ALBERTIN, 2004), como também em casos clínicos de fraturas com anormalidades no processo de consolidação (XAVIER e DUARTE, 1983; MAYR, FRANKEL, RÜTER, 2000).

Existem também evidências da atuação do ultra-som sobre a osteogênese. Estudos “in vitro” relatam aumento de osteoblastos (DOAN *et al*, 1999) e ossificação endocondral em rudimentos ósseos isolados, resultando em aumento do comprimento da diáfise óssea (NOLTE *et al*, 1999).

Porém, ainda é pequeno o número de trabalhos evidenciando a atuação do US pulsado de baixa intensidade em osteoporose, onde a maioria deles ainda tentam reverter o processo e não impedi-lo, tais como nos estudos de WARDEN *et al* (2001b) e CARVALHO e CLIQUET JR. (2003).

Foi observando tal dificuldade que propusemos o presente estudo. Nele avaliamos a atuação do US pulsado de baixa intensidade (30 mw/cm^2 SATA) em fêmur de ratas ovariectomizadas (OVX). O modelo de rata ovariectomizada é o mais aceito por apresentar mecanismos biológicos responsáveis pela perda massa óssea e suas conseqüências semelhantes às encontradas em mulheres após a menopausa (KALU, 1991; FROST e JEE, 1992). Além do que, ratos e humanos respondem similarmente às influências mecânicas, hormonais, drogas e outros fatores, sendo conveniente para avaliação do potencial do agente

terapêutico para a prevenção da osteoporose (PENG *et al.*, 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995). As estimulações foram diárias por 20 e 30 minutos, durante 8 semanas, com início 24 horas após a cirurgia (ovariectomia) objetivando observar a atuação do US pulsado de baixa intensidade na prevenção da osteopenia, antes mesmo que o processo iniciasse.

1.1 O Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo que, juntamente com a cartilagem, constitui o sistema esquelético. Este tecido dinâmico apresenta funções como de proteção de órgãos internos vitais, de suporte para as partes moles, proporcionando apoio aos músculos esqueléticos e transformando suas contrações em movimentos, agindo assim, como um sistema de alavancas ampliando as forças geradas pelas contrações musculares (função mecânica). Além de proteção, o tecido ósseo participa do controle do metabolismo de íons como cálcio e fósforo contribuindo para a homeostase mineral, se apresentando ainda como sítio primário da hematopoiese, desempenhando também importante papel como componente do sistema imune (PARFITT, CHIR, 1987a; EINHORN, 1996 a).

O tecido ósseo é constituído por células, minerais e matriz proteica (osteóide). As células ósseas são de dois tipos: os osteoblastos, que são células jovens responsáveis pela síntese e mineralização do osteóide, que agem nas cavidades formadas pelos osteoclastos, preenchendo-as com osso recém formado e, os osteoclastos que são células gigantes, móveis e multinucleadas com vacúolos providos de enzimas com capacidade de digerir a matriz mineral e orgânica (função osteolítica). Os osteoblastos podem estar em diferentes fases, ou seja: células cuboidais, responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz osteóide ou células do último estágio de diferenciação dos osteoblastos, que ficaram circundados pela matriz mineralizada, os osteócitos. Estes se comunicam com células superficiais e com outros osteócitos através de canaliculos, permitindo a transferência de

sinais e de substratos entre eles. Os osteócitos são importantes no controle das flutuações diárias do níveis de cálcio e fósforo. O componente mineral representa cerca de 65% do tecido ósseo, formado por cálcio e fosfato, os quais formam uma estrutura de um cristal, a hidroxiapatita, um mineral macro-cristalino insolúvel, inicialmente depositado na matriz orgânica como sais de fosfato de cálcio e, posteriormente transformado em cristais de apatita. A matriz protéica é representante de 35% do tecido ósseo, sendo constituída principalmente por fibras colágenas do tipo I e uma variedade de proteínas não colágenas. (KAPLAN, 1995; EINHORN, 1996 a).

Os ossos segundo a forma podem ser classificados em longos, chatos e irregulares. Cada elemento possui morfologia própria, sendo constituído por osso cortical ou compacto, esponjoso ou trabecular e medula óssea em diferentes proporções.

O osso cortical sendo um osso compacto, denso, confere ao esqueleto maior rigidez, correspondendo a 85% do seu total, sendo mais abundante nos ossos longos (esqueleto apendicular) (MUNDY, 1999).

O osso trabecular é encontrado principalmente no esqueleto axilar, corresponde a 15% do esqueleto total, sendo, no entanto, metabolicamente mais ativo que o osso cortical. O osso trabecular está organizado tridimensionalmente na forma de trabéculas, que constituem sua unidade estrutural. As trabéculas se dispõem aleatoriamente no espaço formando uma rede que, ao se conectarem, tornam-se capazes de resistir a cargas mecânicas. Entre elas encontra-se a medula hematopoiética além de vasos sanguíneos, formando a medula óssea (Fig. 1).

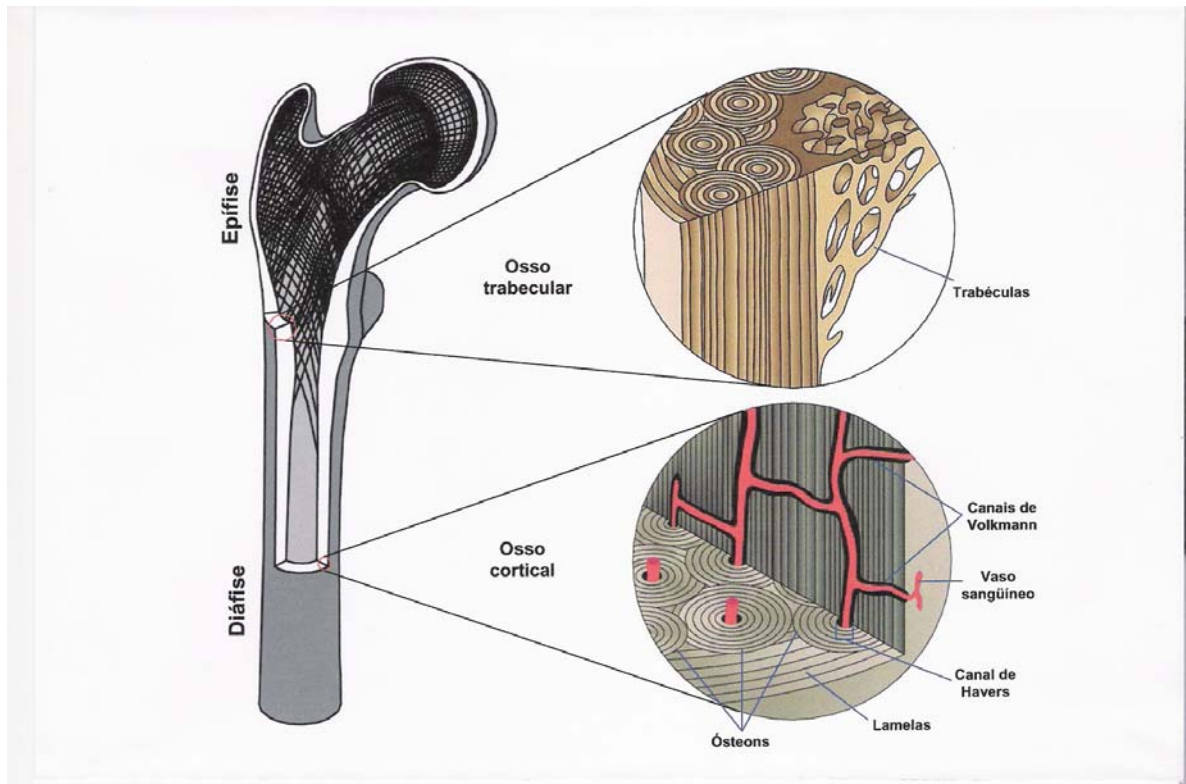


Figura 1 Desenho esquemático do corte de um osso longo (fêmur) mostrando a epífise (osso trabecular) e a diáfise (osso cortical). (SHIMANO,2006)

O tecido ósseo se renova constantemente ao longo da vida do indivíduo, adaptando suas propriedades materiais às solicitações mecânicas que lhe são impostas. É demonstrado na literatura que aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical é renovado anualmente (DEMPSTER et al., 1995). Este processo de formação e reabsorção é denominado remodelação óssea. A remodelação ocorre nas chamadas unidades de remodelação óssea (BRU), das quais fazem parte osteoclastos e osteoblastos. A remodelação óssea é descrita como uma seqüência ativação-reabsorção-formação (ARF), isto é, após um determinado estímulo uma região óssea é ativada, reabsorvida e novamente formada. Para uma determinada quantidade de osso reabsorvida outra é formada na mesma proporção, de modo a manter constante a massa óssea.

O processo de remodelação óssea é regulado por fatores sistêmicos e locais tais como os hormônios reguladores de cálcio, o hormônio paratiroideano (PTH), a vitamina D e calcitonina. Também hormônios que não participam do metabolismo do cálcio, como hormônio do crescimento, hormônios tireoideanos, esteróides sexuais e glicocorticóides atuam de maneira importante sobre o tecido ósseo. Contudo, o estrógeno talvez seja o hormônio mais importante na manutenção do remodelamento ósseo. Sua deficiência leva a uma reabsorção maior que a formação, diminuindo assim a massa óssea, como pode ser observado em mulheres em pós-menopausa. Estudos com animais têm demonstrado que o estrógeno altera a produção e atividade de fatores locais que regulam os precursores osteoblásticos e osteoclásticos (RAISZ, 1999).

1.2 A Osteoporose

A osteoporose é uma patologia generalizada do esqueleto, caracterizada pela redução da massa óssea e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, acarretando fragilidade óssea e, portanto, aumento do risco de fratura (JOHNSTON e SLEMENDA, 1995).

A preservação da massa óssea é resultado da manutenção do equilíbrio entre a formação e reabsorção, isto é da remodelação óssea, mediada por osteoclastos (reabsorção) e osteoblastos (formação). Um aumento da atividade osteoclástica, assim como uma diminuição da atividade osteoblástica, resulta em desequilíbrio desta remodelação, onde as cavidades reabsortivas deixam de ser preenchidas. Este desequilíbrio quando prolongado leva à redução da massa óssea, isto é, à osteopenia que combinada a uma evidência clínica de excessiva fragilidade óssea, constitui-se na osteoporose (PARFITT, 1987 a; PARFITT, 1979).

A massa óssea é determinada por dois fatores: o pico de massa óssea e a frequência e duração de perdas ósseas (VÄÄNAÄNEN, 1991).

O pico de massa óssea, no ser humano, é a quantidade de massa óssea alcançada ao término do crescimento linear normal e é adquirido durante as três primeiras décadas de vida no ser humano. Diversos fatores influenciam a obtenção do pico de massa óssea, dentre eles estão os fatores genéticos, os raciais, a dieta alimentar e atividade física (JOHNSTON e SLEMENDA, 1995). Também cargas mecânicas constituem um fator primário para a aquisição e manutenção da massa óssea (SOGAARD et al, 1994).

Em humanos, ocorre a perda de massa óssea com o envelhecimento como consequência da redução da formação óssea, isto é, declínio da atividade osteoblástica. Em mulheres, a perda de massa óssea ocorre de duas maneiras distintas, por deficiência de estrógeno no período pós menopausa e a relacionada com a idade.

O estrógeno tem função importante na regulação da remodelação óssea. Os osteoblastos possuem receptores de estrógeno e, a partir desta ligação há a liberação de mediadores químicos que inibem a atividade dos osteoclastos (IQBAL, 2000). A deficiência estrogênica causa aumento da frequência de ativação de ciclos de remodelamento (KANIS et al., 1994), aumentando a atividade dos osteoclastos, tornando as trabéculas ósseas mais separadas, mais porosas e com sua conectividade reduzida, e provoca diminuição gradual da espessura do osso cortical (DEMPSTER et al., 1995). Existem evidências de que a produção anormal de citocinas (interleucinas), que estimulam a atividade osteoclástica, possam estar associadas ao aumento da reabsorção óssea por deficiência de estrógeno (KANIS et al., 1994)

A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária, sendo a osteoporose primária a mais freqüente e mais estudada. A osteoporose primária inclui a Osteoporose Juvenil Idiopática, e Osteoporose Involucional que segundo RIGGS e MELTON III (1995) é caracterizada com o avanço da idade, com manifestações em ambos os sexos, sendo subdividida em Osteoporose Tipo I (pós-menopausal) e Osteoporose Tipo II (senil). Assim, a osteoporose tipo I refere-se a perda de osso trabecular após a menopausa,

resultando diretamente da deficiência de estrogênio. A osteoporose tipo II representa a perda de osso cortical e trabecular como resultado final da perda óssea relativa a idade, ocorrendo em ambos os sexos, refletindo influências sobre o processo de remodelamento ósseo a longo prazo, da adequação da dieta de cálcio e vitamina D, da absorção intestinal e da manipulação renal de minerais e, ainda da secreção de paratormônio (PTH).

Já a osteoporose secundária é decorrente de patologias como doenças inflamatórias (artrite reumatóide, espondilite anquilosante, dentre outras) e metabólicas, ou ainda do uso crônico de medicações, como por exemplo os corticosteróides (FROST e JEE, 1992).

A principal repercussão clínica da osteoporose é a fratura, sendo a ela atribuídos os sintomas da osteoporose. Tais fraturas ocorrem mais freqüentemente em vértebras, extremidades distal do rádio e colo de fêmur, podendo ocorrer devido a um trauma mínimo ou mesmo espontaneamente (VÄÄNANEM, 1991; PINTO NETO *et al.*, 2002). As fraturas vertebrais são mais freqüentes que as dos demais segmentos, sendo na maioria das vezes assintomáticas. Porém, são as fraturas de colo de fêmur as de maior letalidade, representando a principal causa de incapacidade na idade avançada (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991).

A Organização Mundial de Saúde definiu osteoporose e osteopenia com base na mensuração da massa óssea para que se tivesse uma definição quantitativa e de uso clínico. Para tanto são utilizados valores absolutos tais como a densidade mineral óssea (BMD) ou o conteúdo mineral ósseo (BMC). A densidade mineral óssea obtida é classificada segundo os desvios padrão (SD) tomando como referência a densidade mineral óssea média em adultos jovens. Um indivíduo para ser considerado normal deve ter uma densidade mineral óssea (BMD) ou o conteúdo mineral ósseo (BMC) com variação de até 1,0 desvio padrão (SD) da média de adultos jovens. Na osteopenia, os valores para BMD ou BMC estariam entre 1-2,5

SDs abaixo da média para adultos jovens normais. Indivíduos com BMD ou BMC de 2,5 SDs ou mais, abaixo do valor médio para adultos jovens normais, devem ser considerados osteoporóticos. Também aqueles que apresentarem valores de BMD ou BMC maiores do que 2,5 SDs abaixo da média para adultos jovens normais, apresentando uma ou mais fraturas, possuem osteoporose severa ou estabelecida (PINTO NETO *et al.*, 2002; SEEMAN e EISMAN, 2004).

1.3 O Tratamento

Por se saber que o osso não consegue recuperar suas condições normais em um quadro de osteoporose instalado, o tratamento deve objetivar a preservação da massa óssea para evitar o risco de fraturas. Para tanto, o tratamento preventivo com a manutenção da massa óssea deve ser valorizado, já que é mais fácil que sua restauração (RIGGS e MELTON III, 1995).

Para prevenir os fatores de risco relacionados à perda óssea, existem tratamentos específicos para a doença tais como os farmacológicos.

Os agentes farmacológicos empregados no tratamento da osteoporose são classificados em duas categorias conforme seu modo de ação: os anti-reabsortivos que levam ao desacoplamento do processo normal de remodelação óssea, diminuindo a reabsorção sem modificação da formação óssea e os estimuladores da formação óssea que atuam estimulando a formação óssea. Dentre os anti-reabsortivos estão o cálcio, a vitamina D, a calcitonina, os bifosfanatos, além da terapia de reposição hormonal (HRT).

O uso da calcitonina tem demonstrado aumentar, mesmo que modestamente, o índice da massa óssea em pacientes com osteoporose estabelecida. Porém apresenta desvantagens, já que é uma terapia de alto custo, além da formação de anticorpos que diminuem a ação de tal substância.

Os bifosfanatos, principalmente o alendronato, agem como inibidores naturais da reabsorção e dissolução dos cristais de fosfato de cálcio, são amplamente utilizados para prevenção de fraturas e perdas ósseas, aumentando a mineralização. Porém, tendo uma vida média no tecido ósseo extremamente longa, em torno de dez anos em humanos e duzentos dias em ratos, sua utilização por um período prolongado pode levar à redução do remodelamento ósseo (WIMALAWANSA, 1993).

Apesar da reposição hormonal ser considerada eficaz para a prevenção e tratamento da osteoporose, diminuindo de 50% a 80% a ocorrência de fraturas vertebrais (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1991) e de 20% a 60% o risco de fratura de quadril (DAWSON-HUGHES, 1999), pode predispor o aparecimento de câncer devido ao fato destes hormônios agirem também em outros locais do organismo, como mamas e endométrio (WIMALAWANSA, 2000).

O fluoreto de sódio, esteróides anabólicos, fragmentos de PTH e fatores de crescimento específicos do osso são exemplos de agentes farmacológicos formadores ósseos. A utilização de doadores de óxido nítrico (NO) e melatonina, em estudos experimentais, têm demonstrado seu efeito protetor sobre o tecido ósseo (BERTONCELLO, 2001; QUEIROZ, 2002; BERTONCELLO, 2005).

Estudos têm analisado a utilização de métodos não farmacológicos ou associado de tratamentos não invasivos no controle da redução da massa óssea. Dentre eles, a atuação de vibrações mecânicas de baixa intensidade e alta frequência sobre a estrutura óssea de ratas ovariectomizadas tem indicado possíveis efeitos benéficos para a preservação da massa óssea com a aplicação de cargas mecânicas (OXLUND et al, 2003).

Também a utilização de campos eletromagnéticos e do laser terapêutico de baixa potência, têm sido estudados visando evitar a perda de massa óssea.

Outro recurso que vem sendo pesquisado atuando sobre a perda de massa óssea é o ultra-som pulsado de baixa intensidade (WARDEN, *et al*, 2001a; CARVALHO e CLIQUET JR., 2003).

Estes estudos estão fundamentados no que se conhece, há mais de um século, como Lei de Wolff, aquela que descreve a habilidade óssea de adaptação à cargas mecânicas funcionais, alterando sua massa e morfologia (WOLFF, 1986). Assim, forças aplicadas sobre o osso resultam em deformação e, conseqüentemente geram estímulos para resposta óssea local, gerando adaptação óssea a estas cargas. Estas cargas parecem regular o processo de remodelação óssea, reduzindo a reabsorção óssea e estimulando sua formação. Estudos demonstram, também, o aumento local do número de osteoblastos em resposta à carga mecânica (PEAD e LANYON, 1989). Também foi constatado que o osso é sensível a estímulos físicos, respondendo com alterações tanto da massa óssea quanto da sua morfologia (DUNCAN e TURNER, 1995), sendo que estímulos mecânicos dinâmicos são mais eficazes na formação óssea, já que sob cargas estáticas o osso se acomoda, tendo uma menor capacidade de resposta ao estímulo (TURNER, 1998).

Ao se deformarem os ossos geram potenciais elétricos locais definidos como potenciais gerados por deformação (SGPs). Esta deformação gera gradientes de pressão no interior dos canaliculos ósseos com conseqüente fluxo de seu fluído intersticial. A geração deste fluxo desempenha importante papel na percepção e resposta do osso às cargas mecânicas, além de permitir um aumento de nutrientes e transporte metabólico (DUNCAN e TURNER, 1995; BURGER e KLEIN-NULEND, 1998). Este fluxo gera forças de cisalhamento sobre a membrana celular dos osteócitos, fazendo com que ajam como sensores de tensão mecânica local, resultando em estímulo para o remodelamento ósseo.

No osso ocorre o fenômeno de transdução mecânica, ou seja, o estímulo biofísico é convertido em um sinal capaz de ser interpretado pela célula (estímulo bioquímico)

que responde através de uma seqüência de eventos. Portanto, a deformação mecânica da matriz óssea gerada por cargas mecânicas é transmitida para as células ósseas resultando em alterações que possibilitam mudanças da regulação da proliferação, diferenciação e morfogênese celular, como também da expressão genética (DUNCAN e TURNER, 1995).

A sensibilidade óssea ao estímulo mecânico é evidenciada em estudos clínicos que demonstram o potencial regulador do exercício (SNOW-HARTER, *et al*, 1992; ROBINSON *et al*, 1995), bem como da perda óssea em tripulantes de vôos espaciais e pacientes acamados (SIMMONS, *et al*, 1981; HARGENS, 1994).

Estudos relatam que após 3 a 5 dias da aplicação de carga mecânica, *in vivo*, há aumento da matriz mineral e colágeno, demonstrando ser este o tempo necessário para a ocorrência dos mecanismos intermediários entre o estímulo mecânico e a formação óssea (GOODSHIP, LANYON, McFIE, 1979; PEAD *et al.*, 1988; DODDS, PEAD, LANYON 1993).

A utilização do ultra-som como fonte de energia mecânica está baseado no potencial anabólico de cargas mecânicas que geram microdeformações locais de forma similar às ocorridas com atuação das cargas mecânicas externas. Para tanto muitos estudos vem sendo propostos com objetivo de analisar sua atuação sobre a atividade óssea.

1.4 O Ultra-Som

O ultra-som é uma forma de energia mecânica transmitida por ondas de pressão acústica de altas freqüência, acima de 16 KHz. Esta energia é transmitida por movimentos das partículas no interior do meio pelo qual a onda propaga, sendo necessário um meio elástico para sua propagação (Ter HARR, 1987).

As ondas ultra-sônicas podem ser longitudinais e transversais. As ondas longitudinais são aquelas em que as partículas se deslocam na mesma direção da propagação

da onda, tendo efeito compressivo, e podem se propagar em meios sólidos, líquidos e gasosos. As ondas transversais são aquelas em que as partículas se deslocam em direção perpendicular à propagação da onda, sendo amortecidas de maneira rápida em líquidos e tecidos moles, propagando-se somente em meios sólidos (WILLIAMS, 1983; Ter HARR, 1987).

Os parâmetros físicos que caracterizam a onda ultra-sônica são definidos como:

- Comprimento de onda (λ): a menor distância entre dois pontos próximos do meio onde se encontram as partículas no mesmo estado de movimento em determinado instante de tempo.
- Período (T): tempo para uma partícula realizar um ciclo completo de movimento.
- Amplitude (A): máximo deslocamento que a partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio.
- Frequência (f): número de vezes em que a partícula realiza um ciclo completo de movimento.
- Velocidade (c): velocidade em que a perturbação move-se ao longo do meio.
- Potência (P): energia total no feixe por unidade de tempo.
- Intensidade (I): energia que atravessa uma unidade de área numa unidade de tempo.
- Atenuação: redução da intensidade de uma onda ultra-sônica conforme ela se distancia de sua fonte, causada por espalhamento e absorção pelo meio.

O aparelho de US consiste de um gerador que produz uma tensão alternada de alta frequência que é convertida por um transdutor em vibrações mecânicas ou acústicas. O transdutor, que é constituído basicamente por um cristal (elemento piezoelétrico) introduzido

entre dois eletrodos, que faz a conversão da voltagem alternada de alta frequência (energia elétrica) em vibrações mecânicas (energia acústica) pela inversão do efeito piezoelétrico (HEKKENBERG e OOSTERBAAN, 1985; KANH, 1991). O cristal pode ser de quartzo, ou uma cerâmica sintética feita de uma mistura de sais complexos como o titanato zirconato de chumbo (PZT).

Ao se colocar um material piezoelétrico em um campo elétrico, as cargas elétricas da rede cristalina do material interagem com este campo, produzindo tensões mecânicas. Um campo elétrico alternado aplicado sobre cristal produz uma variação alternada da sua espessura, que se manifesta como vibração mecânica (efeito piezoelétrico inverso).

A corrente elétrica alternada que alimenta o elemento piezoelétrico pode ser modulada gerando diferentes modalidades de insonação: contínua e pulsada. Desta forma, o US pode ser produzido na forma de ondas contínuas ou pulsadas. No modo contínuo, não ocorre interrupção da propagação de energia, ocorrendo transferência contínua dessa energia para o meio irradiado. Já o modo pulsado apresenta breves interrupções da propagação de energia (KREMKAU, 1985) e resulta em uma redução do aquecimento local, embora com o mesmo nível de estímulo mecânico, o que permite potencializar os efeitos não térmicos do US (DOCKER, 1987).

A maioria dos aparelhos produtores de ondas ultra-sônicas apresenta uma frequência de repetição de pulso de 100Hz. No modo pulsado, essa frequência (ciclo de trabalho) pode ser ajustada segundo a relação entre a duração e o período de repetição do pulso, que pode ser de 1:2, 1:5 e 1:10 (HOOGLAND, 1986). A escolha da forma contínua ou pulsada depende dos efeitos físicos que se deseja obter e a interação entre o ultra-som e o tecido em que está sendo aplicado (McDIARMID e BURNS, 1987).

Quando um tecido (meio heterogêneo) é irradiado com ondas ultra-sônicas, a energia nelas contida diminui com a distância percorrida. Este processo é definido como

atenuação, e produz espalhamento da onda com conseqüente decréscimo da intensidade (Ter HAAR, 1987). A absorção é a dissipação da energia mecânica produzida pelo US origina calor, aumentando a temperatura local. A absorção é dependente da constituição do tipo de tecido que atravessa (quantidade de gordura, fluxo sangüíneo) e da freqüência ultra-sônica aplicada, sendo que altas freqüências são mais absorvidas do que as baixas freqüências (LEHMANN e GUY, 1972).

Os mecanismos físicos pelos quais o US induz respostas clinicamente significativas nos tecidos biológicos são definidos como térmicos (US contínuo) e não térmicos ou mecânicos (US pulsado) (DYSON, 1987; YONG, 1996). Porém, alguns autores preferem não classificar separadamente os efeitos do US, pois os dois não estão totalmente desvinculados. Sempre os efeitos não térmicos serão acompanhados por algum aquecimento pois, a interação entre o US e o tecido é simultaneamente térmica e mecânica (BAKER, ROBERTSON e DUCK, 2001). Conforme o tipo de onda utilizada pode ocorrer a potencializar de um ou de outro efeito. Desta forma, o US contínuo caracteriza-se pela grande produção de calor, que também está presente na forma pulsada, porém de maneira reduzida devido às interrupções regulares da propagação da onda.(PATRICK, 1978).

São exemplos dos efeitos não térmicos a cavitação, o fluxo e o microfluxo acústico. A cavitação, fenômeno descrito por Ter HARR (1987) como sendo um efeito vibracional de micromassagem, com a formação de bolhas no sangue ou fluídos teciduais resultantes das mudanças de pressão no campo acústico, induzidas pelas ondas ultra-sônicas. Quando estas bolhas se contraem e se expandem, conforme a variação de pressão no campo ultra-sônico, o processo é definido como cavitação estável. Quando as bolhas oscilam de forma violenta ocasionando aumento de volume com conseqüente colapso, resultando em grande aumento da temperatura e da pressão local, caracteriza a cavitação transiente. Assim, a cavitação estável tem valor terapêutico, e a transitória pode ser altamente prejudicial aos

tecidos, provocando a desintegração tecidual com formação de radicais livres (LEHMANN e HERRIK, 1953; DYSON, 1987).

DYSON e SUCKLING (1978) propuseram que, em consequência das vibrações longitudinais características do ultra-som, um gradiente de pressão é desenvolvido nas células individuais. Como resultado desta variação de pressão, elementos da célula são obrigados a se movimentarem, ocorrendo, um movimento de micromassagem que aumenta o metabolismo celular, o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio, produzindo alteração da membrana celular e facilitando o fluxo de nutrientes, o que pode explicar alguns dos efeitos benéficos da atuação do US.

O US tem sido empregado na medicina como recurso cirúrgico, como meio de diagnóstico através da análise de imagens e, no tratamento de inúmeras patologias ortopédicas, de doenças músculo-esqueléticas de várias etiologias, na cicatrização de úlceras (DYSON e SUCKLING, 1978), no aumento da circulação sanguínea em tecidos isquêmicos (HOGAN, BURKE, FRANKLIN, 1982), na regeneração muscular (MENEZES, VOLPON e SHIMANO, 1999), no estímulo da angiogênese (DIONÍSIO, 1998) e no reparo ósseo (XAVIER e DUARTE, 1983; WARDEN, *et al.*, 2000; WARDEN, *et al.*, 2001b; WARDEN, *et al.*, 2006), entre outros.

Há ainda que se distinguir entre os dois tipos de US utilizados, o ultra-som terapêutico (UST) e US pulsado de baixa intensidade, empregados clinicamente, onde não há grandes diferenças quanto ao circuito gerador dos equipamentos, mas há diferenças quanto a forma da onda gerada e dos parâmetros utilizados.

Assim, em se comparando o US pulsado de baixa intensidade com o UST quanto à largura de pulso, esta se apresenta como dez vezes menor (200 μ s) no US pulsado de baixa intensidade do que no UST (2 ms).

A frequência fundamental do US pulsado de baixa intensidade mais utilizada é de 1,5 MHz, enquanto que a frequência utilizada no UST varia de 1 a 3 MHz. A atenuação aumenta com frequências maiores, assim a energia transmitida com 3MHz é absorvida pelos tecidos superficiais enquanto a energia transmitida com frequências menores penetra mais profundamente nos tecidos (LOW e REED, 2001).

Há ainda grandes variações da potência e da intensidade entre o US pulsado de baixa intensidade e o UST. Este último gera potência acústica de 1 a 25W e intensidade de 0,1 a 3 W/cm² (NYBORG e WU, 1993), capaz de gerar efeito térmico. O US pulsado de baixa intensidade gera potência em torno de 150 mW e intensidade em torno de 30 mW/cm² sendo considerado não térmico pois, a quantidade de energia que é convertida em calor é proporcional à intensidade do ultra-som utilizado, portanto intensidades baixas, menores que 100 mW/cm² não tem efeito térmico (DINNO et al., 1989).

Estudos demonstraram que, com a utilização do US pulsado de baixa intensidade em reparo de osteotomia não houve aumento significativo da temperatura, isto é, menor que 0,01°C (DUARTE, 1983). Tal resposta confirmou ser a atuação do US pulsado de baixa intensidade um efeito mecânico e não térmico caracterizado pelo fornecimento de onda pulsada de alta frequência e intensidade baixa.

Assim, a estimulação ultra-sônica com conseqüente propagação do US estabelece no tecido ósseo um campo de deformações elásticas associado a regiões de rarefação e compressão da onda de pressão. Este campo desenvolve potenciais elétricos determinados pelo efeito piezoelétrico, resultando em um sinal elétrico como resposta óssea, isto é, esta polarização faz com que os osteoblastos alterem seus potenciais de membrana permitindo um bombeamento de íons e captação de nutrientes, estimulando eletricamente o metabolismo ósseo.

A resposta óssea ao método ultra-sônico é semelhante ao processo natural de osteogênese devido à piezoelectricidade do osso, que responde eletricamente à atuação de cargas mecânicas devido ao próprio peso corporal, à deambulação, ao exercício físico e até mesmo em repouso, quando a balística cardíaca produz ondas de choque que atingem o osso. Esta resposta elétrica aciona o metabolismo celular, mantendo o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

A diversidade de modelos experimentais descritos na literatura apresentam grandes variações quanto aos parâmetros do ultra-som utilizados no reparo de fraturas recentes, pseudoartroses e osteoporose.

O uso de frequências variando de 1 a 3MHz se deve ao fato da energia acústica sofrer atenuação pelos tecidos. Assim, frequências menores de 1 a 1,5 MHz atingem tecidos mais profundos, enquanto frequências maiores de até 3 MHz são mais superficiais.

Um dos primeiros estudos controlados utilizando o ultra-som contínuo em fraturas de rádio de coelhos demonstrou a possibilidade do ultra-som estimular a formação do calo ósseo. Fato que veio a liderar o primeiro uso clínico do US na consolidação de fraturas de oito pacientes demonstrando ser um tratamento seguro e produzindo um aumento do calo ósseo. (CORRADI e COZZOLINO, 1952; CORRADI e COZZOLINO, 1953).

A utilização de intensidades baixas de 30 mw/cm^2 SATA e frequência de 1,5 MHz, com intervalos de pulsos de $200\mu\text{s}$, frequência de repetição de 1KHz, vem sendo demonstrado por muitos autores como eficazes no reparo de fraturas ósseas.

O US tem sido utilizado na regeneração óssea como foi demonstrado no trabalho experimental pioneiro realizado por Duarte (1977 - 1983) em osteotomias de fibulas de coelhos, obtendo a aceleração do processo de consolidação na ordem de 50%, sugerindo ainda, que o processo de mineralização do calo ósseo ocorreu mais precocemente quando o sítio de osteotomia foi exposto ao ultra-som pulsado de baixa intensidade.

A partir de então o US pulsado vem sendo utilizado experimentalmente no reparo de fraturas e osteotomias por vários pesquisadores, dentre eles:

DYSON e BROKES (1983) – US pulsado com intensidade de 500mw/ cm²e 200mw/ cm² em fraturas de fíbulas de ratos e em coelhos, demonstraram aceleração da consolidação.

PILLA e colaboradores (1990) e WANG e colaboradores (1994) – estudo com US pulsado de baixa intensidade (30 mw/cm² SATA e frequência de 1,5 MHz, com intervalos de pulsos de 200µs, frequência de repetição de 1KHz) em osteotomias e fraturas fíbulas de coelhos, demonstraram que os ossos expostos ao US alcançaram integridade biomecânica com aumento da rigidez mecânica em aproximadamente metade do tempo quando comparados com o grupo não tratado. Estes dados foram confirmados posteriormente por JINGUSHI e colaboradores em 1998. Embora os resultados obtidos por GUERINO *et al.* (1997) utilizando os mesmos parâmetros, não demonstraram diferenças entre os grupos controle e tratado, quanto aos parâmetros biomecânicos os autores afirmaram que o ultra-som melhorou a rigidez óssea.

O US pulsado de baixa intensidade tem sido utilizado também em osteogênese, em modelo experimental de implantes intramedulares em ulna de cães, demonstrando aumento de volume ósseo; e teve atuação positiva em alongamento de tibia de coelhos e em modelo de não união de tibia de ratos, favorecendo quantitativa e qualitativamente o reparo ósseo com aumento significativo da área do calo (TANZER, KANTOR e BODYN, 2001; SHIMAZAKI *et al.* 2000; TAKIKAWA *et al* (2001). Mais recentemente, SCHORTINGHUIS e colaboradores (2004) utilizando em modelo experimental de lesões em cortical de mandíbula de ratos, não observaram diferenças significativas quando comparado ao controle.

A utilização do UST (usado normalmente por fisioterapeutas) com intensidade de 0,1 w/cm² em fraturas experimentais de fêmur de ratos adultos, demonstrou não haver

diferença da massa e força óssea dos grupos tratados com US por 25 dias quando comparados com seus controles, porém houve aumento da resistência mecânica e densidade óssea dos ossos tratados por 40 dias. Tais respostas indicaram que o US produzido por unidades convencionais de ultra-som terapêutico podem ser usadas para facilitar o reparo ósseo de fraturas, porém, há a necessidade de mais estudos controlados para que seja confirmado o uso clínico, no reparo de fraturas, de tal instrumento (WARDEN *et al.*, 2006).

A atuação do ultra-som tem sido demonstrada também em:

- em culturas de células ósseas, como demonstraram REHER *et al.* (1997) que o US de baixa intensidade estimulou significativamente a síntese de proteínas da matriz óssea, enquanto que altas intensidades a inibiu. Fêmures de ratos com suas diáfises perfuradas foram mantidos em meio de cultura de tecidos e estimulados com ultra-som (770 mw/cm^2 e 320 mw/cm^2) e demonstraram aceleração da regeneração de osso trabecular e redução da síntese de prostaglandina E_2 , indicando uma relação entre os dois processos (SUN *et al.*, 1999). Já, KOKUBO e colaboradores (1999) demonstraram que utilizando ultra-som com intensidades menores (30 mw/cm^2) em culturas de osteoblastos de camundongos havia um aumento da síntese de prostaglandina E_2 . O uso do US associado à vitaminas em culturas de osteoblastos de ratos também estimulou a secreção de fatores de crescimento, a atividade mitocondrial e diminuição dos precursores de osteoclastos, sugerindo que o ultra-som de baixa intensidade pode não só estimular a formação óssea como diminuir uma possível reabsorção (ITO *et al.*, 2000; NARUSE *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2003).

- em fusão de vértebras de coelhos, aumentando a taxa de fusão, rigidez e carga máxima de ruptura, demonstrando que o US pode influenciar processos celulares não só do esqueleto apendicular como também do axial (GLAZER *et al.*, 1998; GAMA, 2002).

- uso clínico: US pulsado de baixa intensidade utilizado em pacientes portadores de pseudoartroses e/ou retardo de consolidação de fraturas com índice de 70% de

sucesso. Aceleração do processo de consolidação de fraturas como complemento ao tratamento ortopédico convencional, com diminuição significativa do tempo de cura clínica e radiológica (XAVIER e DUARTE, 1983; HECKMAN *et al.*, 1994; KRISTIANSEN *et al.*, 1997). Consolidação de fraturas em 95% dos 162 pacientes portadores de osteoporoses, para a prevenção da osteoporose conseqüente da lesão do nervo espinhal, demonstrando não haver diferenças significativa entre o osso tratado e o seu controle contralateral e, como tratamento alternativo não farmacológico do US de baixa intensidade como estímulo mecânico em pacientes lesados medulares que desenvolvem osteoporose por desuso (ARAI *et al.*, 1993; FRANKEL, 1998; WARDEN *et al.*, 2001b; CARVALHO D. C. L., CARVALHO, M. M., CLIQUET JR, 2001). Estudo realizado com pacientes portadores de doenças ou que utilizavam medicamentos que comprometiam a recuperação de fraturas e pseudoartroses demonstrou que houve reparo das fraturas em 92% de diabéticos, 95% com osteoporose, 92% em alcoólatras e dependentes de drogas, 86% com insuficiência vascular, 91% dos que usavam esteróides, 89% com uso de anti-inflamatórios não esteróides e 90% com uso de bloqueadores de canais de cálcio e 100% com infecções locais (HADJIARGYROU, *et al.*, 1998; MAYR *et al.*, 2000).

- em osteoporose experimental: FAGANELLO e CARVALHO (1999) propuseram um estudo comparativo do uso do US contínuo e pulsado em fraturas de ratas osteopênicas. Estes autores demonstraram que nas fraturas estimuladas com US contínuo houve o bloqueio da reparação óssea, enquanto que nas tratadas com US pulsado houve a formação do calo ósseo. WARDEN e colaboradores (2001a) analisaram os efeitos do US pulsado de baixa intensidade em fêmur e tíbia de ratas osteopênicas, e através de análises de densitometria (DEXA) e histomorfometria demonstraram que o US não influenciou mudanças ósseas resultantes da osteopenia. Enquanto, CARVALHO e CLIQUET JR (2003), utilizando o US pulsado de baixa intensidade com os mesmos parâmetros que Warden, sugeriram a

atuação positiva do ultra-som na osteoporose, apesar dos resultados quantitativos do conteúdo mineral ósseo não terem demonstrado diferenças significativas entre os grupos tratados e controles. Mas, os resultados da análise histológica mostraram que os grupos tratados apresentaram uma menor deterioração microarquitetural e ocorreu neoformação óssea, o que não foi observado nos grupos controles.

1.5 O Modelo Experimental de Osteoporose Humana

O emprego de ratos como bons modelos animais para o estudo da osteopenia humana, mesmo não apresentando sistema haversiano característico e nem fraturas osteoporóticas, já está bem estabelecido na literatura (DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992; PENG *et al.*, 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995).

Trabalhos realizados com ratos possibilitam uma avaliação completa do tecido ósseo (arquitetura, resistência e massa óssea) o que não é possível com relação a seres humanos em estudos clínicos (MOSEKILDE, 1995).

O estudo em ratos apresenta vantagens, tais como baixo custo, padronização, curto período de observação e fácil manutenção. Além do que, ratos são animais geneticamente bem definidos, assemelhando-se ao ser humano em vários aspectos como a presença de osso cortical e trabecular, alterações ósseas similares às observadas na menopausa e no envelhecimento ou decorrentes da ovariectomia (WRONSKI *et al.*, 1989; MOSEKILDE, DANIELSEN e KNUDSEN, 1993). Estes animais respondem similarmente também às influências mecânicas e farmacológicas (FROST e JEE, 1992).

Em ratos, o pico de massa óssea ocorre próximo de um ano alterando-se até o envelhecimento. Porém, observou-se que aos três meses de idade esses animais já alcançaram a maturidade, ou seja, são reprodutivamente maduros e capazes de responder adequadamente a deficiência de hormônios sexuais e às alterações que se seguem à castração. Mesmo que

ainda exista um pequeno crescimento ósseo em animais com três meses de idade, a utilização deste animal nesta idade é vantajosa em relação aos animais com crescimento ósseo definido (12 meses) pela facilidade de manutenção e praticidade, já que as alterações ósseas são mais rápidas a partir de quatro semanas da ovariectomia. Animais com três meses de idade são denominados “maduros” (KALU, 1991) e nesta idade observa-se também o seu alto grau de remodelação óssea semelhante a dos humanos adultos, sendo indicado como modelo ideal de osteoporose.

Estudos demonstraram que a ovariectomia acarreta perda de osso trabecular da tíbia e vértebra devido à deficiência estrogênica. O mecanismo mais aceito que justifique tal perda de massa óssea se baseia no desequilíbrio da remodelação óssea, com a reabsorção excedendo a formação óssea (WRONSKI e YEN, 1991; KALU, 1991; FROST e JEE, 1992). Porém no osso cortical esta perda óssea não é bem caracterizada como a preconizada por KALU (1991) onde existe uma perda maior de osso trabecular que cortical em mulheres menopausadas.

Existe ainda uma variedade de modelos de osteopenia experimental induzida principalmente por deficiência ou excesso hormonais, dos quais se destaca a ovariectomia, a orquiectomia, hipofisectomia, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo, diabete induzido; induzida por glicocorticóides; deficiências de vitaminas e cálcio; imobilização dos membros posteriores, dentre outros (MILLER, BROWMAN e JEE, 1995).

1.6 Métodos de Análise da Qualidade Óssea

Vários métodos de análises são empregados para a determinar a perda óssea. A radiologia convencional proporciona informações sobre a estrutura, qualidade e quantidade óssea. Exames de radiogrametria, fotodensitometria radiológica, absorciometria por fóton, tomografia computadorizada quantitativa, analisam a arquitetura óssea e as estruturas que as

compõem. Também mensurações corporais, análise ultra-sônica e biópsia óssea são exemplos de análise para verificação do tecido ósseo (WOOLF e DIXON, 1988). Alguns marcadores também são indicadores do grau e da variação da formação e reabsorção óssea. Alterações dos níveis sanguíneos de cálcio e fósforo, embora não sejam tão conclusivos, são indicativos de doença do metabolismo ósseo.

É possível analisar as estruturas ósseas através de parâmetros que quantifiquem os minerais presentes, bem como as cargas suportadas pelo osso. Assim, a dosagem de cálcio e fosfato podem ser úteis no sentido de indicar a quantidade de material mineral. Quando se realiza a pesagem óssea, seja com o osso intacto ou já desidratado ou incinerado, pode-se inferir o percentual de material orgânico e de água presentes.

Associados às medidas citadas, já identificadas na literatura, estão os parâmetros biomecânicos, que avaliam a resistência do material a uma força externa aplicada à estrutura óssea. Parâmetros como carga máxima (carga máxima aplicada no momento da fratura óssea), deformação (distância movida pela carga até chegar a fratura), rigidez (determinada através da inclinação da reta R ajustada aos pontos da curva carga *versus* deformação na fase elástica), resiliência (energia absorvida pelo osso na fase elástica), tenacidade (energia absorvida pelo osso até a ruptura) são importantes para especificar a qualidade da estrutura óssea (PENG et al., 1994; SØGAARD *et al.*, 1994; MOSEKILDE, THOMSEN e McOSKER, 1997).

1.7 Utilização das Propriedades Biomecânicas para a Análise de Perdas Óssea

Desde há muito tempo tem-se observado que a arquitetura inerente ao osso é influenciada pela tensão mecânica associada à função normal. Uma definição mais formal desta relação estrutura/função foi definida por anatomistas e engenheiros alemães no final do século XIX que tem sido conhecida como Lei de Wolff. Os princípios da Lei de Wolff estão

baseados no conceito de que há uma correlação entre o padrão de alinhamento trabecular e a direção da tensão que ocorre na função normal. Assim, em condições fisiológicas normais, a relação estrutura/função observada no osso, associado a seu papel de manutenção da homeostase mineral, sugere que o osso seja um órgão de “*design*” ótimo (EINHORN, 1996 b).

Os ossos, devido à sua função, são constantemente submetidos a diversos tipos de esforços à semelhança de materiais estruturais utilizados na engenharia. Sendo assim, o estudo do comportamento mecânico dos ossos pode ser realizado utilizando-se os mesmos princípios e conceitos da engenharia.

As propriedades mecânicas definem o comportamento de um material, quando sujeito a esforços de natureza mecânica e correspondem às propriedades que, em um material específico, determinam a sua capacidade de resistir aos esforços aplicados, sem romper ou sem que produzam deformações incontroláveis.

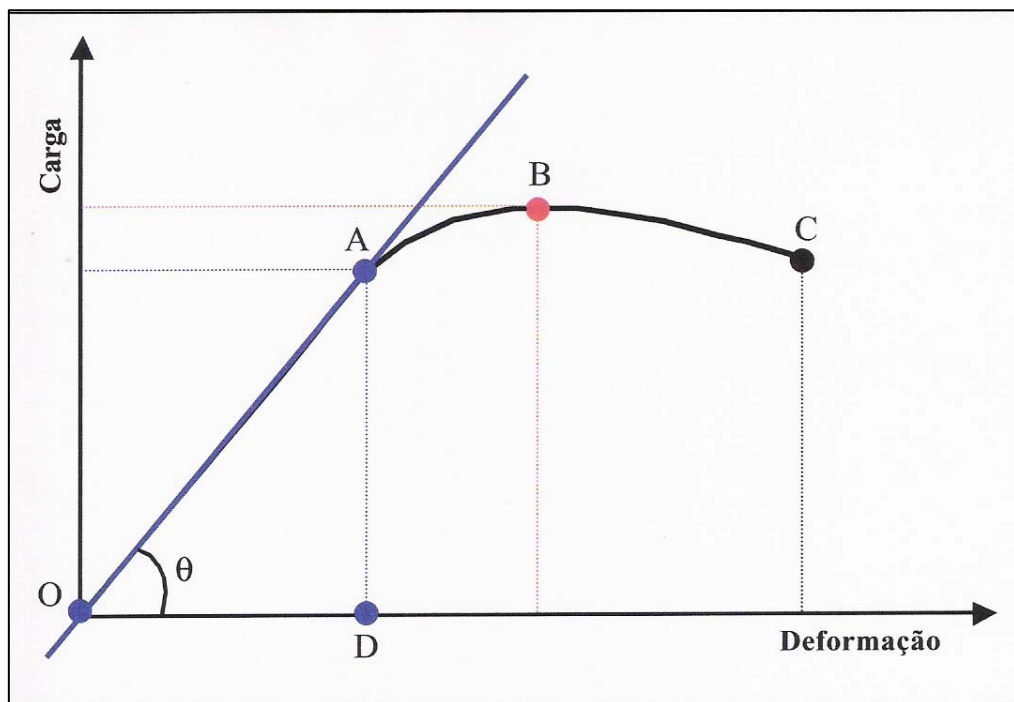


Figura 2 - Representação da curva carga *versus* deformação mostrando os diversos parâmetros biomecânicos. A – Limite de proporcionalidade, B – Limite Máximo, C- Ponto de ruptura, Resiliência – Área do Triângulo OAD, Tenacidade-Área total abaixo da curva, Rigidez – tangente de θ .

A relação entre a carga aplicada a uma estrutura e a deformação em resposta à carga pode ser observada através de uma curva traçada pelo gráfico “carga *versus* deformação”, ou pelo gráfico “tensão *versus* deformação” quando a estrutura ensaiada for um corpo de prova com dimensões conhecidas. Esta curva pode ser dividida em duas regiões: a região de deformação elástica (fase elástica) e a região de deformação plástica (fase plástica). O limite entre as duas regiões é definido como limite de proporcionalidade ou limite elástico, como mostra a figura 2.

A região de deformação elástica imita o comportamento de uma mola, onde a deformação aumenta linearmente com o aumento da carga e, após a retirada da carga, retorna à forma original. Porém, sendo o osso um material viscoelástico, este comportamento de mola perfeita não pode ser considerado, pois efeitos viscoelásticos durante a deformação, em função dos fluidos presentes na matriz óssea, causam perda de energia elástica. A deformação é caracterizada por retardos, já que leva um certo tempo para iniciar após a aplicação da carga, como também para cessar após a interrupção da mesma (CALLISTER e WILEY, 1994).

Na região plástica, o material estará com deformações permanentes mas, em muitos casos, esta região é importante, principalmente quando a ruptura não pode ocorrer imediatamente após o limite elástico. Isto é, o material deverá absorver energia antes de romper.

A inclinação da curva carga *versus* deformação na região elástica determina a rigidez extrínseca ou estrutural, onde os ossos maiores possuem uma maior rigidez. Ao se converter a carga em tensão relativa e a deformação em deformação relativa, obtém-se uma curva tensão *versus* deformação relativa e a inclinação desta curva na região elástica determina o módulo de elasticidade ou módulo de Young e representa a rigidez intrínseca do material (TURNER e BURR, 1993). Esta diferença pode ser observada quando se compara

ensaios em ossos inteiros (rigidez extrínseca) com ensaios realizados em corpos de prova de osso (rigidez intrínseca).

O tecido ósseo por ser um tecido heterogêneo formado por materiais diferentes (hidroxiapatita e colágeno), distribuído de diferentes formas (lamelas ósseas, trabéculas, etc.), dá aos ossos comportamento mecânico característico tais como viscoelasticidade, anisotropia e não homogeneidade.

O comportamento de um material viscoelástico é o conjunto de comportamentos de um material elástico com o de um material viscoso (SEDLIN, 1965). Um material com comportamento elástico ideal é caracterizado pelo armazenamento de toda energia fornecida a ele durante o processo de deformação mecânica, na forma de energia potencial elástica, e é devolvida ao se retirar o esforço que a causou (comportamento de mola). Um material com comportamento viscoso se caracteriza por ter toda energia a ele fornecida no processo de deformação mecânica dissipada na forma de calor (comportamento de um amortecedor). Uma caracterização importante dos materiais viscoelásticos é a dependência do comportamento mecânico com a taxa de carregamento, isto é, a velocidade de aplicação da carga.

A anisotropia é característica de certos materiais de não apresentarem propriedades mecânicas iguais em todas as direções de carregamento. Ou seja, o comportamento mecânico depende diretamente da direção e do sentido da força aplicada. No osso, por ser um material heterogêneo, o comportamento mecânico varia de região para região em um mesmo material. O osso como material, é mais resistente na orientação longitudinal que nas direções radiais ou tangenciais. Isto se deve principalmente ao fato de que os osteons são orientados ao longo do eixo longitudinal do osso e estão ligados ao material ósseo das regiões vizinhas.

Os ensaios mecânicos permitem determinar propriedades mecânicas de um material, podendo ser destrutivos ou não destrutivos. Nos destrutivos ocorre a ruptura ou inutilização do material, sendo ensaios de compressão, flexão, tração, torção e fadiga exemplos deste tipo de ensaio. Já os ensaios não destrutivos são aqueles que preservam a estrutura do material, como os de raios-X, ultra-som, dentre outros. A escolha adequada do tipo de ensaio depende principalmente do material, do tipo de esforço que este material vai sofrer e das propriedades mecânicas que se deseja medir (SOUZA, 1974).

A alta concentração de colágeno da fase orgânica permite ao osso resistir a tensões de tração, enquanto a fase inorgânica lhe dá excelente resistência às tensões de compressão (TUREK, 1991).

Para o osso trabecular a definição de rigidez é mais difícil, pois sendo formado por trabéculas individuais, com rigidez própria, contribuem com a rigidez única de toda a estrutura. Assim, o osso trabecular possui uma rigidez material, isto é a rigidez de cada trabécula e uma rigidez estrutural que é a rigidez da estrutura trabecular disposta espacialmente. A maioria dos estudos concentram sua atenção às propriedades estruturais devido a grande dificuldade do estudo em trabéculas individuais. As propriedades estruturais variam nas diferentes regiões dependentes da densidade e da orientação das trabéculas.

Para determinar as propriedades do osso trabecular, alguns métodos foram propostos para ensaiar vértebras e o colo femural (HOU *et al.*, 1990; ANDREASSEN; MELSEN; OXLUND, 1996). Para vértebras, é aplicada uma força de compressão ao corpo vertebral inteiro ou a uma secção do meio da vértebra, para que se tenha superfícies paralelas e planas. Já para o colo femural, uma força de compressão é aplicada à cabeça do fêmur, produzindo assim tensões de flexão e compressão.

HOGAN, RUHMANN e SAMPSON (2000) propuseram um estudo com osso trabecular de ratas ovariectomizadas. Foram retiradas da metáfise proximal das tíbias destes

animais, secções transversais de 2mm de espessura que eram compostas internamente por osso trabecular e contornada por osso cortical. Foram realizados dois tipos de ensaios de compressão nestas secções. No primeiro a secção foi colocada entre dois pratos paralelos para a compressão e, no segundo utilizaram um dispositivo para comprimir somente o osso trabecular do interior da secção.

OXLUND *et al.* (2003), analisando a metáfise distal do fêmur de ratas ovariectomizadas através do ensaio de compressão, obtiveram, após 3 meses de cirurgia diminuição de 23% da carga máxima no grupo de ratas ovariectomizadas quando comparadas ao grupo controle.

Com base nestes estudos com o osso trabecular, propusemos o tipo de ensaio realizado com nossas amostras no presente estudo.

1.8 A Histomorfometria Óssea

A histomorfometria óssea, que diferentemente da histologia que nos fornece informação qualitativa quanto à estrutura geral e distribuição dos componentes morfológicos ósseos, inclui medidas destes componentes tais como, espessura de osteóides e de trabéculas, isto é medidas de variáveis estáticas, que são obtidas diretamente. A histomorfometria pode também avaliar variáveis cinéticas, usando para isto marcadores fluorescentes, que são administrados em diferentes intervalos de tempo, que se integram ao osso em formação. Através da análise da distância entre as marcações obtém-se a taxa de formação óssea e informações sobre outros processos metabólicos ósseos. A análise histomorfométrica é realizada com luz, luz polarizada, e microscopia fluorescente; sistema de placa ótica e equipamentos computadorizados digitais (ERIKSEN, AXELROD e MELSEN, 1994).

A histomorfometria óssea ainda é o único método que permite a análise direta e precisa de mecanismos celulares e teciduais do remodelamento ósseo envolvidos com a

fisiopatologia da osteoporose. Ela possibilita avaliações do nível intermediário da organização óssea, isto é, no osso cortical, do osteon e, a unidade estrutural trabecular básica no tecido esponjoso, indicativos da atividade osteoblástica. Fornece ainda informação dinâmica através do uso de marcadores como a tetraciclina, que permite a introdução da dimensão de tempo nas análises quantitativas (MEUNIER, 1995).

De todas as substâncias que marcam o osso neoformado, a tetraciclina é a mais utilizada, pois quando administrada *in vivo*, se incorpora nos tecidos em calcificação e exibe fluorescência ao serem iluminadas com luz ultravioleta, possibilitando a avaliação da velocidade de formação óssea, parâmetro importante para análise do crescimento ósseo e para o diagnóstico de doenças ósseas.

O método consiste em se administrar duas doses de tetraciclina em intervalos de alguns dias (cinco dias em média). Em seguida é feita a biópsia óssea e os cortes são examinados ao microscópio de fluorescência. O osso marcado por tetraciclina apresenta forte fluorescência de coloração amarelada a laranja em fundo margenta fraco e, o osso maduro apresenta uma fluorescência azul fraca. Após a injeção de tetraciclina, os níveis séricos permanecem suficientemente elevados para a captação adequada pelo osso neoformado. Na microscopia por fluorescência, observam-se faixas estreitas de fluorescência onde o osso foi ativamente formado enquanto esteve exposto à tetraciclina. As duas faixas de fluorescência estarão separadas por um intervalo de osso novo não marcado que se formou durante o período entre a administração das doses. A distância entre as duas faixas fluorescentes é proporcional à velocidade de formação óssea.

No animal de experimentação, trinta minutos após a injeção intraperitoneal de tetraciclina, desenvolve uma fluorescência amarela difusa no osso. Após 24 horas, a fluorescência difusa desaparece, permanecendo como faixas amarelas brilhantes nos locais de formação ativa de osso neoformado.

O uso clínico da histomorfometria óssea como método de diagnóstico tem progredido, sendo muito utilizado na avaliação e acompanhamento da osteoporose onde, pode-se obter informações quanto ao diagnóstico de doenças ósseas, avaliação dos mecanismos heterogêneos de perda óssea das síndromes osteoporóticas, com diferentes distúrbios do remodelamento ósseo em níveis orgânicos, teciduais e celulares, avaliação dos efeitos de tratamentos do remodelamento ósseo e avaliação da qualidade óssea demonstrada na análise da microarquitetura óssea, particularmente da rede trabecular; a textura da matriz óssea, isto é, a presença de osso lamelar ou imaturo; a possível presença de defeitos de mineralização, ambos em superfície ósseas ou intersticiais, que colocam em risco a resistência óssea e as outras propriedades biomecânicas do osso (MEUNIER, 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a osteopenia induzida pela ovariectomia em ratas, através da análise de parâmetros físicos, biomecânicos e histomorfométricos do fêmur.

2.2 Específicos

Observar o ganho de peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais, ocorrido durante o período experimental.

Verificar a eficácia do procedimento metodológico utilizado para indução de osteopenia em ratas.

Comparar os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a osteopenia induzida pela ovariectomia nos tempos de 30 e 20 min de estimulação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Os Animais

Foram utilizadas ratas Wistar adultas, com 4 meses de idade pesando $250\text{g} \pm 6,62$, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidas no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia/DCF, onde foi realizado o experimento.

Os animais foram mantidos em regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlados ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), alimentados com ração comercial e água à vontade.

Após o término do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação e seus fêmures direito foram retirados, dissecados e mantidos em salina a 0,9% a -20°C até o início das análises.

3.2 A Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada segundo a técnica descrita por Zarrow *et al.* (1964).

3.3 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em 6 grupos denominados:

- Grupo US 30 min. (US 30 – n=9): ratas ovariectomizadas (OVX) que receberam estimulação ultrassônica durante 30 minutos.
-
- Grupo US 20 min. (US 20 – n=6): ratas ovariectomizadas (OVX) que receberam estimulação ultrassônica durante 20 minutos.

- Grupo Sham 30 min. (Sh 30 – n=6): ratas ovariectomizadas (OVX) que receberam estimulação fictícia (aparelho de ultra-som desligado) durante 30 minutos.
- Grupo Sham 20 min. (Sh 20 – n=12): ratas ovariectomizadas (OVX) que receberam estimulação fictícia (aparelho de ultra-som desligado) durante 20 minutos.
- Grupo Intacto 30 min (Inta 30 – n=7): ratas intactas que receberam estimulação fictícia (aparelho de ultra-som desligado) durante 30 minutos.
- Grupo Intacto 20 min (Inta 20 – n=8): ratas intactas que receberam estimulação fictícia (aparelho de ultra-som desligado) durante 20 minutos.

3.4 O Tratamento

Após 24 horas da ovariectomia foi iniciado o tratamento com ultra-som pulsado de baixa intensidade. O tratamento foi realizado durante 5 dias/semana, durante 20 e 30 minutos, por um período de 8 semanas.

O aparelho de ultra-som foi fornecido pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de São Carlos, com transdutor de PZT (titanato zirconato de chumbo), com ondas ultra-sônicas com frequência fundamental de 1,5 MHz, largura de pulso de 200 μ s, frequência de repetição de pulsos de 1,0 KHz e intensidade espacial e temporal média (SATA) de 30 mw/cm^2 . Estes parâmetros são utilizados em estudos clínicos e experimentais na consolidação de fraturas, já aprovados pelo FDA americano.

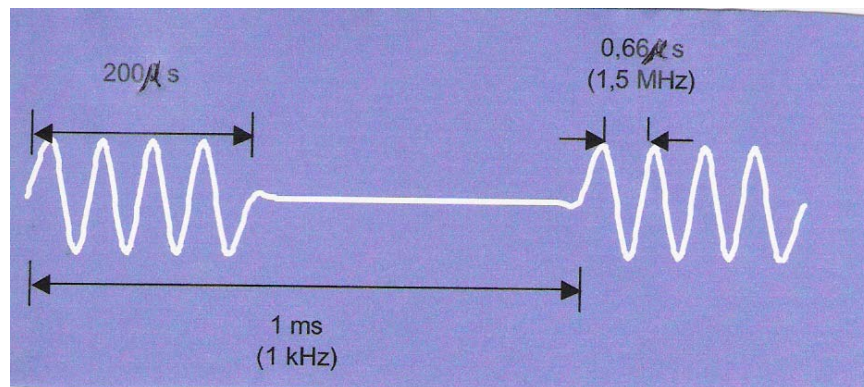


Figura 3 – Representação esquemática da onda de ultra-som pulsado

A calibração do equipamento foi realizada com balança de radiação acústica (UPM-DT-1, Ohmic Instruments, EUA) previamente à sua utilização no experimento.



Figura 4 - Animal no Tubo de contenção e Aparelho de Ultra-som

Os animais foram colocados em tubos de contenção com a pata traseira direita imobilizada. O tubo de contenção foi utilizado para que não houvesse a necessidade do uso de anestésico, o que poderia interferir nos resultados.

A estimulação com o ultra-som foi realizada no fêmur direito após tricotomia semanal do mesmo e aplicação de gel hidrossolúvel entre o transdutor e a pele do animal, com a finalidade de facilitar a condução da onda ultrassônica.

O mesmo procedimento foi realizado também nos grupos Sham e Intacto.



Figura 5 - Foto da estimulação

3.5 Variáveis Estudadas

3.5.1 Peso Corporal

Os animais foram pesados semanalmente no decorrer das 8 semanas de tratamento com a finalidade de análise da variação da massa corporal, desde o início ao fim do experimento.

3.5.2 Propriedades Biomecânicas do Fêmur

As propriedades biomecânicas do fêmur direito foram obtidas a partir de ensaio mecânico (compressão óssea) da cabeça do fêmur realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar em uma máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) (Figura 6).

Doze horas antes da retirada da cabeça do fêmur para o ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento da realização dos cortes.



Figura 6 - Máquina de Ensaio Universal (Instron 4444) durante o ensaio de compressão da cabeça do fêmur. A, célula de carga ligada à ponte de extensometria; B, haste cilíndrica para aplicação de carga (força); C, osso; D, suporte; E, painel de controle

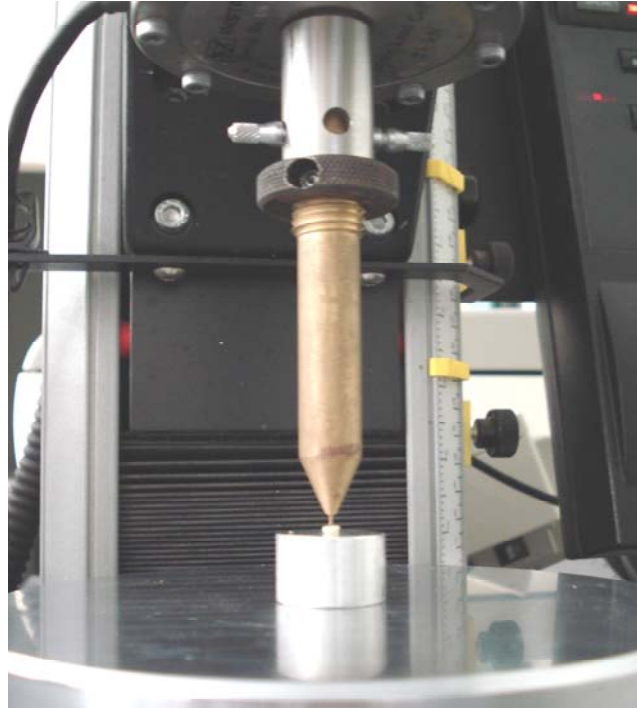


Figura 7 - Detalhe do ensaio de compressão da cabeça do fêmur



Figura 8 - Foto ampliada do fêmur para retirada da cabeça

Para o teste de compressão, as cabeças dos fêmures foram retiradas da região do colo femural e através de dois cortes paralelos (Figura 8), retiradas as corticais, garantindo assim o ensaio somente do osso trabecular. Para os cortes foi utilizada uma cortadeira metalográfica com discos diamantados ISOMET 1000 – marca BUEHLER®. A compressão foi realizada utilizando-se uma haste cilíndrica de 0,7 mm de diâmetro, carregada com célula de carga de 100 Kgf com velocidade constante de 5 mm/min. A força aplicada e o deslocamento foram monitorados e registrados através de um “*software*” próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidos as curvas força *versus* deformação e determinados os parâmetros biomecânicos tais como força máxima, deslocamento máximo, resiliência, tenacidade e rigidez, para a análise da qualidade óssea.

3.5.3 Propriedades Físicas do Fêmur

Após o teste de compressão da cabeça do fêmur, os ossos foram colocados em água destilada e levados ao dessecador onde permaneceram por 24 horas, com a finalidade de ser retirado o ar existente nos poros ósseos. Foram verificados as seguintes medidas de peso do osso: peso imerso (P_i) e peso úmido (P_u). A seguir, os ossos foram colocados em estufa a 100° C durante 24 horas para serem desidratados, para, em seguida determinar-se o peso seco (P_s). Para a obtenção do material mineral, os ossos foram colocados em uma mufla a 800°C durante 24 horas, do qual também se verificou o peso das cinzas (P) (CANOTILHO, 1996). Para obtenção de todas as medidas citadas, foi utilizada balança eletrônica (marca Chyo).

Com base nestes dados, o volume ósseo foi calculado seguindo o princípio de Arquimedes, e a partir deste as densidades óssea e mineral puderam ser calculadas, como também os percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral conforme as fórmulas abaixo (MARTIN, 1990).

$$\text{Volume Ósseo} = \frac{\text{Peso Úmido} - \text{Peso Imerso}}{\text{Densidade da Água}} \quad (\text{cm}^3)$$

$$\text{Densidade Óssea} = \frac{\text{Peso Úmido}}{\text{Volume}} \quad (\text{g/cm}^3)$$

$$\text{Densidade Mineral} = \frac{\text{Peso Cinzas}}{\text{Volume}} \quad (\text{g/cm}^3)$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = 100 \times \frac{(\text{Peso Úmido} - \text{Peso Seco})}{\text{Peso Úmido}} \quad (\%)$$

$$\text{Percentual Ósseo de Material Orgânico} = 100 \times \frac{(\text{Peso Seco} - \text{Peso Cinzas})}{\text{Peso Úmido}} \quad (\%)$$

$$\text{Percentual Ósseo de Material Mineral} = 100 \times \frac{(\text{Peso Cinzas})}{\text{Peso Seco}} \quad (\%)$$

3.5.4 Análise Histomorfométrica

As extremidades distais dos fêmures direitos seguiram o protocolo para histologia do tecido ósseo calcificado utilizado pelo Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP, com a supervisão da Prof^a Dr^a Vanda Jorgetti (Metabolismo Ósseo).

- 1- Fixação: amostra óssea mantida em etanol a 70% por 3 dias a 4° C.
- 2- Desidratação: permanência em etanol a 100% por 3 a 5 dias a 4° C.
- 3- Tolueno: permanência em tolueno por um dia a 4° C.

Penetração pela resina: a 4° C por 3 a 5 dias cada fase

- permanência em Solução A (75% Metilmetacrilato e 25% Dibutiftalato)
- permanência em Solução A + peróxido de benzoila a 1%
- permanência em Solução A + peróxido de benzoila a 2%

4- Transferência da amostra para uma estufa a 37°C por 48 horas até o endurecimento do bloco.

5- Preparação do bloco

6- Microtomia: Em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio JUNG (modelo K), foram realizadas secções do bloco em cortes histológicos de 5 a 7 µm para a coloração (análise dos parâmetros estáticos na histomorfometria) e cortes de 10 µm não corados para fluorescência (parâmetros dinâmicos).

Os cortes foram colocados em lâminas gelatinadas e esticados com álcool 50% e 100%. Após a microtomia as lâminas foram colocadas em estufa a 27° C por cerca de 12 horas.

7- Desplastificação: Os cortes foram desplastificados em Metilmetacrilato puro por 20-40 minutos e em seguida desidratados em Etanol absoluto. Reidratados em Etanol 50% e por fim água destilada.

A partir deste estágio o material desplastificado é corado com azul de toluidina 0,1% por cerca de 10 minutos, clareado no tolueno e montado.

Para realização da histomorfometria, foi utilizado um microscópio Nikon Labophot-2A com aumento de 20x1,25x10, com cursor, com câmera de vídeo e placa digitalizadora, e o “*software*” Osteomeasure (Osteometrics, Inc.). As medidas foram realizadas em vinte campos na área da epífise distal dos fêmures, 0,5 mm da placa de crescimento epifisária, equidistante das duas corticais. As imagens histológicas foram desenhadas com auxílio do cursor sob a placa digitalizadora, captadas pela câmera e transmitidas para o “*software*” para análise quantitativa das estruturas e estudo da microarquitetura do tecido ósseo.

A histomorfometria dos parâmetros estáticos foi feita com análise semi-automática (Osteomeasure). As denominações dos parâmetros medidos, traduzidos para o português, assim como as abreviaturas (não traduzidas), seguiram a nomenclatura padronizada pela American Society of Bone and Mineral Research (PARFITT, 1987 b).

Foram analisados os seguintes parâmetros histomorfométricos estáticos:

1. Volume ósseo (BV/TV %): percentual do volume ósseo total (medula e trabéculas) constituído por osso trabecular, mineralizado ou não.;
2. Espessura trabecular (Tb. Th μm): espessura das trabéculas ósseas.
3. Separação trabecular (Tb.Sp μm): distância entre as trabéculas ósseas
4. Número de trabéculas (Tb.N/mm): número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular.

No presente estudo foi realizada a marcação com tetraciclina, porém devido ao congelamento dos ossos não foi possível uma leitura clara, não permitindo a obtenção dos índices histomorfométricos dinâmicos.

3.6 Análise Estatística

Os valores de todas as determinações são expressos como média \pm E.P.M e foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. A análise estatística para a determinação do modelo de osteoporose induzida pela ovariectomia comparou grupo intacto (não ovariectomizado) com grupo OVX (ovariectomizado) e para a determinação da atuação do US pulsado de baixa intensidade comparou grupo US (ovariectomizado e estimulados) com grupo Sham OVX (ovariectomizado e estimulação

ficícia), utilizando teste-t não pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, seguindo os critérios de normalidade e homocedacidade (GraphPad InStat v. 3.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.7 Norma Metodológica

As citações, referências bibliográficas, estrutura e composição deste trabalho seguiram a Norma 10520/2002 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As referências estão conforme a NBR 6023 e as citações segundo a NBR 10520 (DUPAS, 2004).

4 RESULTADOS

4.1 A Ovariectomia

A eficácia da ovariectomia foi observada no momento do sacrifício com a atrofia uterina.

4.2 Peso Corporal

Os dados de ganho de peso corporal dos animais ovariectomizados sham (30 e 20 min.) não estimulados mostraram um aumento quando comparados com os animais intactos (30 e 20 min.) ($p=0,0433$ e $p=0,0009$). O ganho de peso corporal não foi influenciado pelo US, tanto nos tratados por 20 ou 30 minutos demonstrado na Tabela 1 e Figura 9 e 10 .

Tabela 1 : Peso Corporal Inicial e Final e Ganho de Peso dos animais dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Peso Corporal Inicial (g)	Peso Corporal Final (g)	Ganho de Peso Corporal (g)
Inta 30	226,00 \pm 9,04	259,00 \pm 8,76	33,00 \pm 2,45
Sham 30	241,40 \pm 7,68	288,80 \pm 7,75*	47,40 \pm 6,08*
US 30	242,00 \pm 6,02	281,00 \pm 7,08	39,00 \pm 6,04
Inta 20	246,00 \pm 6,99	277,50 \pm 7,11	31,50 \pm 2,09
Sham 20	231,00 \pm 5,67	280,87 \pm 4,75	49,20 \pm 3,12@
US 20	233,80 \pm 5,94	276,20 \pm 4,87	42,46 \pm 5,39

P < 0,05 * vs inta 30 (n=7) e @ vs inta 20 (n=8)

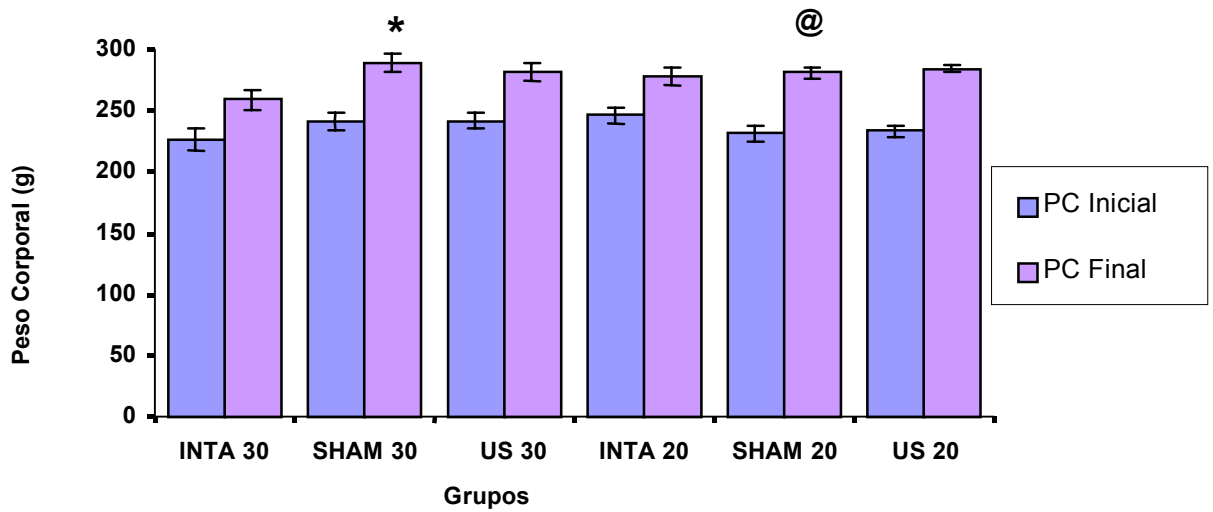


Figura 9 – Média \pm EPM do Peso Corporal Inicial e Final dos animais dos diferentes grupos experimentais

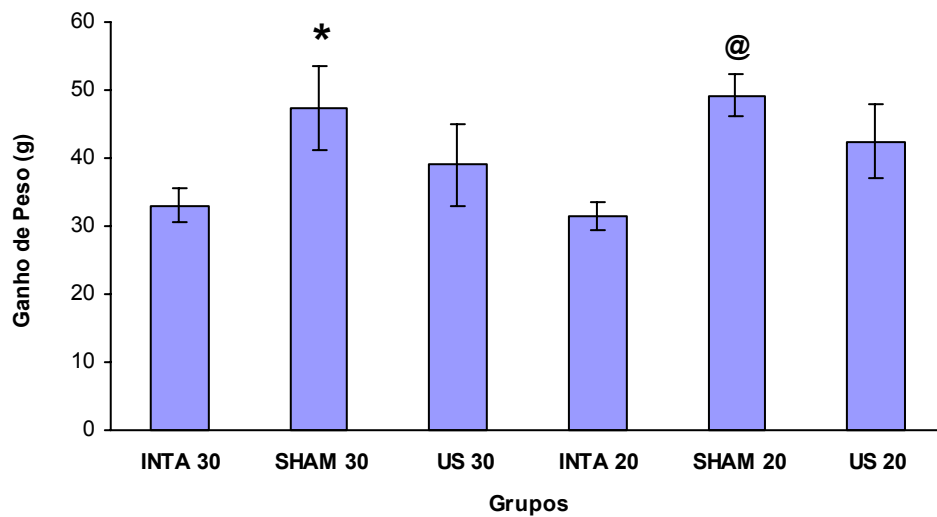


Figura 10 Média \pm EPM do ganho de peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais * $p < 0.05$ vs INTA 30 (n=7), @ $p < 0.05$ vs INTA 20 (n=8)

4.3 Parâmetros Físicos

As Tabelas 2 e 3 e a Figura 11 apresenta os parâmetros físicos da cabeça do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 2 - Parâmetros Físicos da Cabeça do Femur dos animais dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Peso Úmido (g)	Peso Imerso (g)	Peso Seco (g)	Peso Cinzas (g)	Volume Ósseo (cm ³)
Inta 30	0,0334 \pm 0,0012	0,0125 \pm 0,0005	0,0216 \pm 0,0009	0,0143 \pm 0,0007	0,0209 \pm 0,0009
Sham 30	0,0344 \pm 0,0005	0,0129 \pm 0,0002	0,0212 \pm 0,0005	0,0142 \pm 0,0005	0,0215 \pm 0,0003
US 30	0,0351 \pm 0,0010	0,0125 \pm 0,0004	0,0211 \pm 0,0007	0,0140 \pm 0,0004	0,0226 \pm 0,0008
Inta 20	0,0357 \pm 0,0012	0,0126 \pm 0,0005	0,0227 \pm 0,0008	0,0148 \pm 0,0006	0,0231 \pm 0,0008
Sham 20	0,0325 \pm 0,0006	0,0132 \pm 0,0009	0,0202 \pm 0,0003	0,0136 \pm 0,0002	0,0193 \pm 0,0007@
US 20	0,0313 \pm 0,0002	0,0144 \pm 0,0012	0,0191 \pm 0,0003	0,0128 \pm 0,0002	0,0170 \pm 0,0013

P < 0,05 @ vs inta 20 (n=8)

Tabela 3 - Parâmetros Físicos da Cabeça do Femur dos animais dos diferentes grupos experimentais: Densidade Óssea (D.Óssea), Densidade Mineral (D.Mineral), Porcentagem de Água (% de Água), de Material Orgânico e de Material Mineral (Média \pm EPM).

Grupos	D. Óssea	D. Mineral	% de Água	% Material Orgânico	% Material Mineral
Inta 30	1,60 \pm 0,0212	0,6864 \pm 0,0154	35,46 \pm 0,9407	21,67 \pm 0,4582	42,86 \pm 0,7398
Sham 30	1,60 \pm 0,0087	0,6607 \pm 0,0213	38,35 \pm 0,8813*	20,43 \pm 0,7869	40,28 \pm 0,862*
US 30	1,56 \pm 0,0279#	0,6255 \pm 0,0166	39,78 \pm 0,8029	20,18 \pm 0,6280	40,04 \pm 0,5434
Inta 20	1,55 \pm 0,0100	0,6416 \pm 0,0197	36,50 \pm 0,4633	22,04 \pm 1,1175	42,86 \pm 0,739
Sham 20	1,71 \pm 0,0823	0,7175 \pm 0,0331	37,77 \pm 0,7973@	19,48 \pm 0,4085@	40,88 \pm 0,500@
US 20	1,91 \pm 0,1448	0,7779 \pm 0,0563	39,05 \pm 0,5357	20,05 \pm 0,4301	40,90 \pm 0,4919

P < 0,05 * vs inta 30 (n=7) , @ vs inta 20 (n=8) e # vs sh 30 (n=6)

Quanto aos parâmetros físicos da cabeça do fêmur observou-se uma diminuição de material mineral e orgânico do grupo sham 20 em relação ao inta 20, e uma diminuição de material mineral do sham 30 em relação ao inta 30. Tais reduções foram compensadas pelo aumento da porcentagem óssea de água dos animais ovariectomizados sham 20 e sham 30 em relação aos respectivos intactos (Tabela 3).

Em relação ao volume e densidade óssea, observou-se diminuição do volume ósseo do grupo inta 20 em relação ao sham 20 e diminuição da densidade óssea do grupo US 30 em relação ao sham 30, como mostram as Tabelas 2 e 3

4.4 Parâmetros Biomecânicos

A Tabela 4 e a Figura 12 apresentam os parâmetros biomecânicos da cabeça do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos com o teste de compressão.

Tabela 4 - Parâmetros Biomecânicos da Cabeça do Femur dos animais dos diferentes grupos experimentais: Força Máxima (Força Max.), Deslocamento Máximo (Desloc. Max.), Resiliência, Tenacidade e Rigidez (Média \pm EPM).

Grupos	Força Máx. (N)	Desloc. Max. (cm) x 10 ⁻³	Resiliência (J) x 10 ⁻³	Tenacidade (Mpa) x 10 ⁻³	Rigidez (N/mm)
Inta 30	54,81 \pm 1,67	375,7 \pm 0,0312	7,90 \pm 0,0005	3,20 \pm 0,0002	284,97 \pm 16,46
Sham 30	39,06 \pm 5,84*	280,0 \pm 0,0228*	6,20 \pm 0,0015	2,50 \pm 0,0003*	261,52 \pm 21,47
US 30	35,75 \pm 2,89	341,7 \pm 0,0332	5,90 \pm 0,0006	2,20 \pm 0,0002	226,52 \pm 29,55
Inta 20	47,81 \pm 10,48	328,6 \pm 0,0440	6,30 \pm 0,0008	3,10 \pm 0,0003	294,81 \pm 34,14
Sham 20	33,85 \pm 2,15@	388,2 \pm 0,0370	6,00 \pm 0,0011	2,40 \pm 0,0001@	234,19 \pm 10,32@
US 20	35,50 \pm 2,60	230,0 \pm 0,0289#	5,20 \pm 0,0015	2,40 \pm 0,0002	278,58 \pm 4,12#

P < 0,05 * vs inta 30 (n=7), @ vs inta 20 (n=8) e # vs sh 20

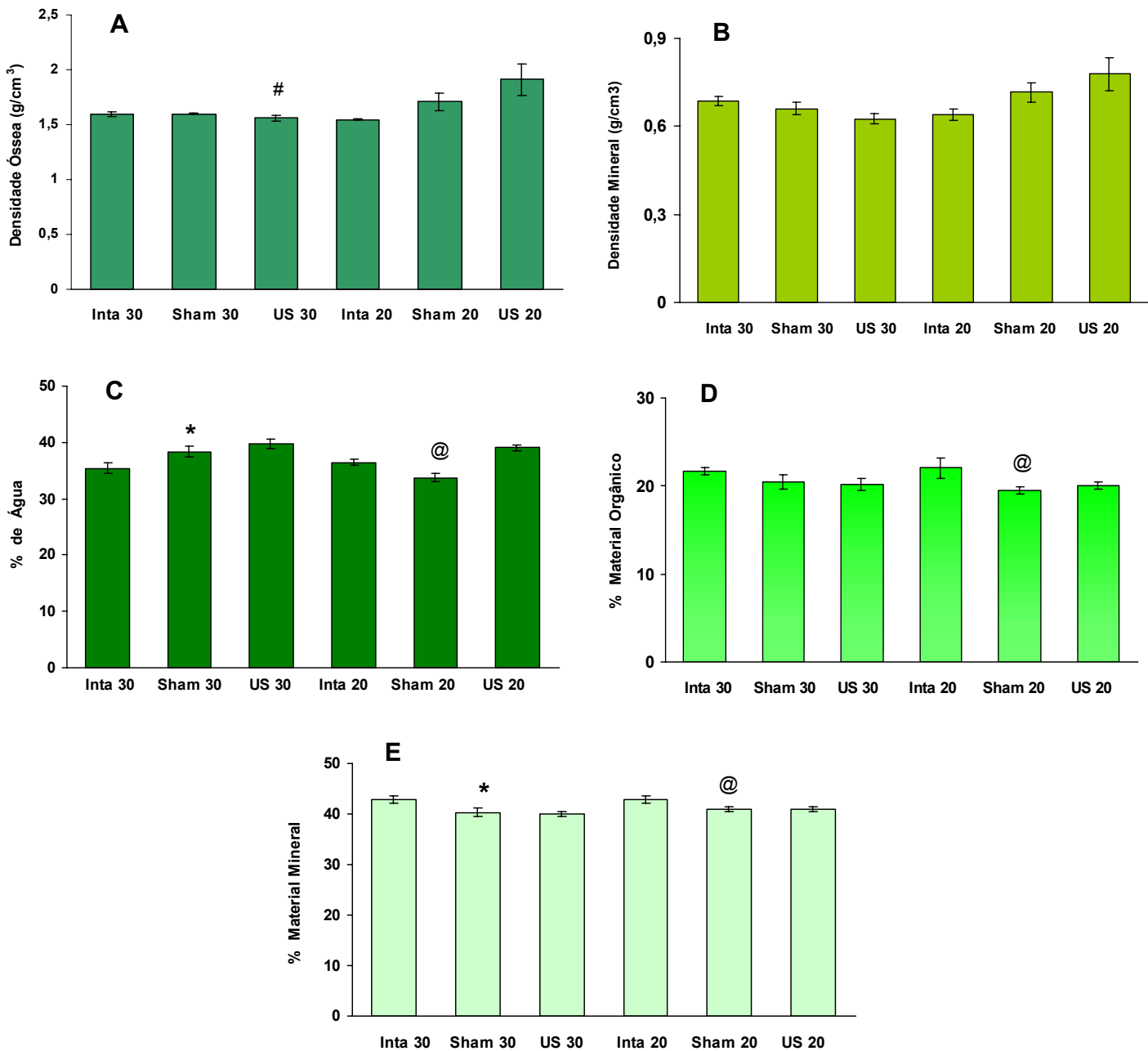


Figura 11 Média \pm EPM da Densidade Óssea (A), Densidade Mineral (B), Porcentagem de Água (C), Porcentagem de Material Orgânico (D) e Porcentagem de Material Orgânico (E) do corpo de prova da cabeça do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais. $p < 0,05$ # vs Sh 30 (n=6), * vs INTA 30 (n=7), @ vs INTA 20 (n=8).

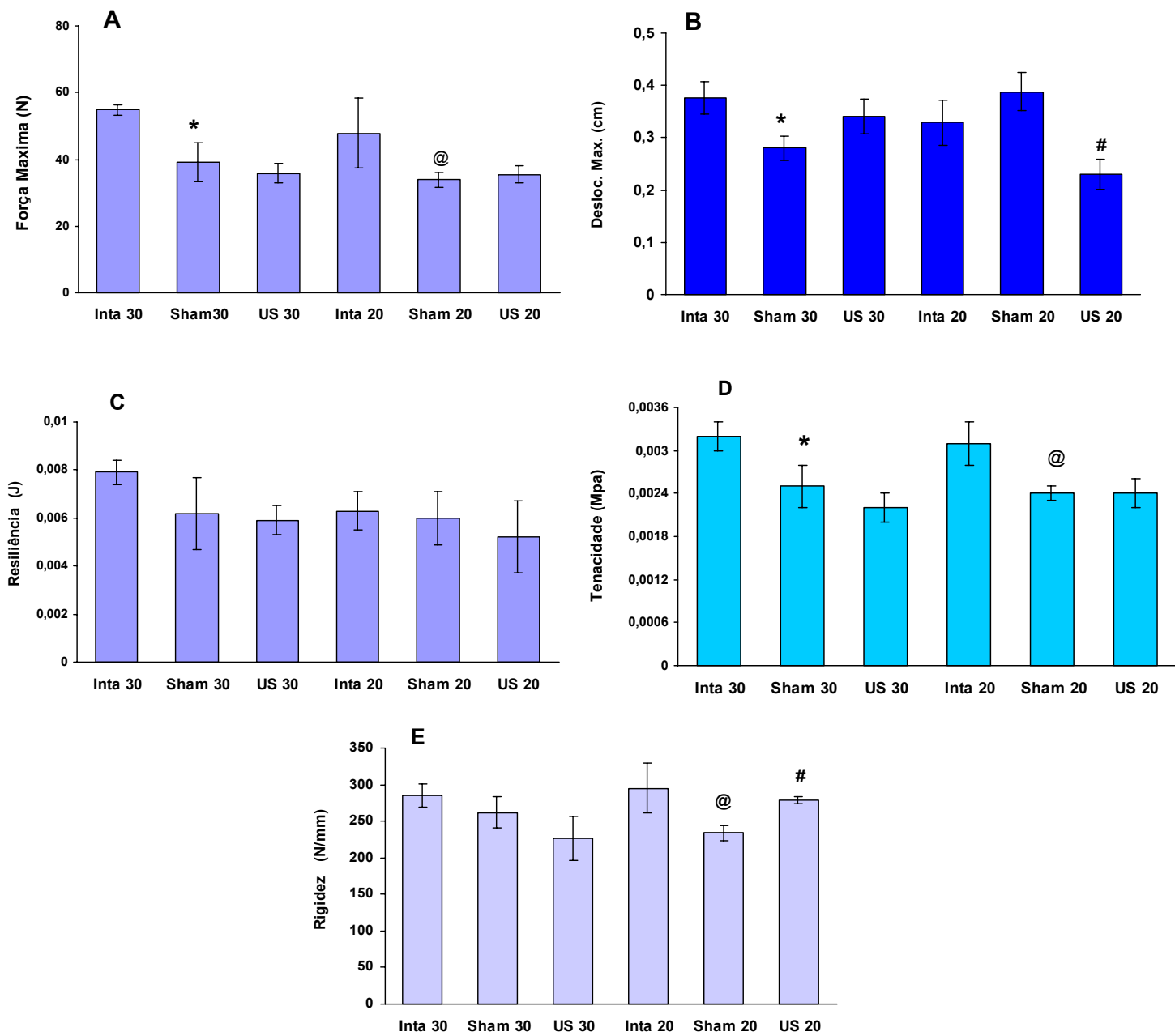


Figura 12 Média \pm EPM da Força Máxima (A), Deslocamento Máximo (B), Resiliência (C), Tenacidade (D) e Rigidez (E) do corpo de prova da cabeça do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais. $p < 0,05$ # vs Sh 20 (n=12), * vs INTA 30 (n=7), @ vs INTA 20 (n=8)

Quanto aos resultados do teste biomecânico, as propriedades mecânicas da cabeça do fêmur apresentaram uma redução da força máxima dos grupos inta 20 e inta 30 em relação aos respectivos grupos sham (Tabela 4).

Em relação à resiliência não foram observadas diferenças quando se comparam os diferentes grupos, porém, quanto à tenacidade observou-se uma diminuição significativa dos grupos sham 20 e 30 em relação ao inta 20 e 30. Também foi observado um menor deslocamento máximo acompanhado de maior rigidez no grupo US 20 em relação ao grupo sham 20 (Tabela 4).

4.4 Parâmetros Histomorfométricos

A Tabela 5 e a Figura 13 apresentam os parâmetros histomorfométricos da região distal do fêmur dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5 - Parâmetros Histomorfométricos da região distal do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais: Volume Ósseo (BV/TV), Separação das Trabéculas (TbSp), Número de Trabéculas (TbN) e Espessura de Trabéculas (TbTh) (Média ± EPM).

Grupos	BV/TV (%) Volume Ósseo	TbSp(μm) Sep. Trab	TbN(/mm) N° Trab.	TbTh(μm) Espes. Trab.
Inta 30	48,37 ± 3,12	69,34 ± 3,93	7,47 ± 0,33	66,03 ± 6,18
Sham 30	32,36 ± 3,21 [*]	132,64 ± 18,55 [*]	5,40 ± 0,45 [*]	59,84 ± 2,84
US 30	26,21 ± 1,53 [#]	152,47 ± 8,10	4,84 ± 0,19	54,62 ± 3,35
Inta 20	39,91 ± 1,67	87,29 ± 3,45	6,87 ± 0,09	58,31 ± 2,33
Sham 20	31,14 ± 2,52 [@]	121,58 ± 11,72 [@]	5,53 ± 0,26 [@]	66,28 ± 2,75 [@]
US 20	27,97 ± 3,50	177,75 ± 43,61 [⊕]	4,60 ± 0,57	60,67 ± 1,71

P < 0,05 * vs inta 30 (N=7), @ vs inta 20 (N=8), # vs sh 30 (n=6) e ⊕ vs sh 20 (n=12)

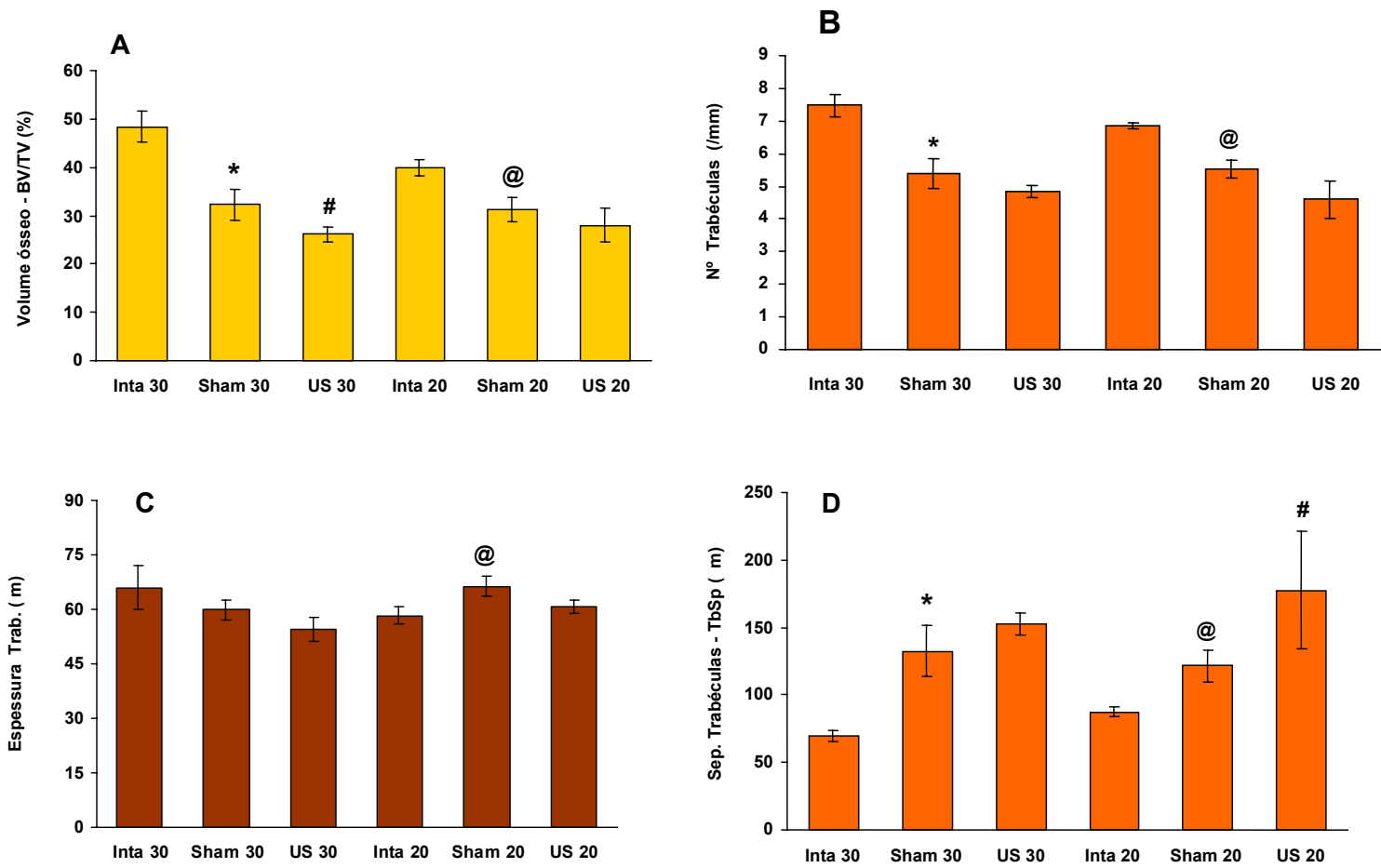


Figura 13 Média \pm EPM do Volume Ósseo (A), Separação Trabecular (B), Nº de Trabéculas (C) e Espessura Trabecular (D) da região distal do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais $p < 0,05$. # vs Sh 30 (n=6), * vs INTA 30 (n=7), @ vs INTA 20 (n=8)

Através da análise histomorfométrica do osso trabecular, nos grupos sham nos tempos de 20 e 30 minutos, foram observadas diminuições na relação BV/TV – volume ósseo, e redução do TbN – número de trabéculas, como também nos parâmetros TbSp – separação entre trabéculas quando comparado aos respectivos intactos. Quanto a TbTh – espessura das trabéculas houve um aumento do grupo sham 20 quando se compara com inta 20 (Tabela 5) .

5 DISCUSSÃO

A ovariectomia sendo um procedimento cirúrgico de simples realização cujos efeitos sobre o esqueleto do animal se manifestam rapidamente, permite a possibilidade de estudos de eventos associados à osteoporose pós-menopausal. (MILLER, BOWMAN e JEE, 1995). Também, a escolha deste modelo animal baseou-se no fato de ocorrerem alterações semelhantes às que ocorrem na rede trabecular observadas no esqueleto humano quando da deficiência estrogênica (MOSEKILDE, 1995).

A utilização de ratas ovariectomizadas em nosso estudo vem mais uma vez confirmar a eficácia do modelo de osteopenia induzida pela ovariectomia, modelo este descrito por Kalu (1991), demonstrando que a deficiência hormonal ovariana ocasionou um maior ganho de peso corporal e uma perda óssea significativa, quando comparamos animais intactos e ovariectomizados (WRONSKI *et al.*, 1987; FROST e JEE, 1992).

O maior ganho de peso corporal em ratas ovariectomizadas, estatisticamente significativo, quando comparado com ratas intactas, observado em nosso trabalho, vem confirmar o preconizado na literatura quando se refere ao ganho de peso corporal em ratas ovariectomizadas em consequência do aumento da quantidade de gordura e não pelo aumento de massa magra, indicando que este aumento deve ser devido a um mecanismo de compensação da perda óssea induzida pela ovariectomia, aumentando o estresse mecânico sobre os ossos. (KALU, 1989; DANIELSEN, MOSEKILDE, SVENSTRUP, 1993; THOMPSON *et al.*, 1995).

Os nossos resultados mostram que o ganho de peso corporal não foi influenciado pelo ultra-som tal qual ficou demonstrado anteriormente por WARDEN e colaboradores. (2001a).

A ovariectomia induziu a osteopenia quando se observou a redução dos percentuais ósseos (Tabelas 2 e 3) demonstrado pela diminuição do conteúdo mineral ósseo

compensado pelo aumento do teor de água do osso, como já determinado na literatura (KALU, 1991; PENG *et al.*, 1994; COXAM *et al.*, 1996).

Nós utilizamos o osso trabecular para a determinação das propriedades ósseas em nossos estudos pois, muito embora a osteoporose seja caracterizada como uma patologia sistêmica com redução da massa óssea (osteopenia) e deterioração microarquitetural do tecido ósseo (cortical e trabecular), o osso trabecular se mostra mais sensível às mudanças metabólicas tais como a deficiência estrogênica resultando em perda de massa óssea mais rapidamente que no osso cortical, o que determina uma diminuição do conteúdo mineral ósseo responsável pela força suportada por ele. (KALU, 1991; SOGAARD *et al.*, 1994; MANOLAGAS e JILKA, 1995; MOSEKILDE, DANIELSEN e KNUDSEN, 1993). Estas alterações diminuem também o número de trabéculas e perda da conectividade entre elas (PENG *et al.*, 1994; DEMPSTER *et al.*, 1995; THOMPSON *et al.*, 1995; SHEN e WRONSKI, 1997). Sendo ainda de grande importância a contribuição do osso trabecular do ponto de vista mecânico, pois é demonstrado que em corpos vertebrais o osso trabecular suporta aproximadamente a metade da carga imposta a ele, e transmite tal força mecânica à sua cortical.

O tecido trabecular quando comprometido por patologias que deterioram-no, torna estas regiões ósseas frágeis, não respondendo satisfatoriamente à ação mecânica. Para tanto, escolhemos a região da cabeça e distal do fêmur para a determinação de parâmetros físicos, biomecânicos e histomorfométricos. Pudemos observar redução de material mineral acarretando redução da força máxima, deslocamento máximo, tenacidade e rigidez associado à deterioração da microarquitetura do osso trabecular. Os resultados da análise das propriedades físicas e biomecânicas corroboram as diferenças estruturais demonstradas pela histomorfometria quando observamos uma maior separação entre as trabéculas ósseas, o que

caracteriza maior reabsorção óssea, acompanhado da redução do volume ósseo e número de trabéculas no grupo de animais ovariectomizados quando comparados ao grupo de intactos.

Também, diferentemente do que tem sido realizado por grande parte dos estudos anteriores, a nossa análise se restringiu apenas às propriedades do osso como material e não como estrutura. Nestes estudos, quando se analisa ossos inteiros, o comportamento mecânico não depende apenas da massa do tecido e de suas propriedades materiais, mas também de sua geometria e arquitetura (EINHORN, 1992).

Desta forma, também utilizamos o ensaio de compressão, já que o ensaio de flexão é o mais indicado para testar propriedades mecânicas do fêmur (estrutura) quanto à região cortical, o que não era nosso objetivo, pois tal ensaio não evidenciaria alterações das propriedades mecânicas devido à ovariectomia, isto é, mudanças mais pronunciadas no osso trabecular. É uma região com predominância de osso cortical. (MOSEKILDE *et al*, 1994; SOGAARD *et al*, 1994; MOSEKILDE, DANIELSEN e KNUDSEN, 1993), seria menos sensível ao estímulo ultrassônico.

Em nosso estudo, o ultra-som pulsado de baixa intensidade em fêmur de ratas ovariectomizadas não evitou a osteopenia. Isto ficou demonstrado quando se comparou os resultados obtidos quanto às propriedades físicas, biomecânicas e histomorfométricas dos animais dos grupos sham e US, tanto nos tempos de 30 quanto de 20 minutos. Onde, mesmo ocorrendo uma redução do deslocamento máximo e aumento da rigidez no grupo US com 20 minutos de estimulação, indicando uma atuação benéfica, esta variação porém, não foi confirmada pela análise histomorfométrica, que mostrou aumento da separação trabecular, indicando a não atuação do US pulsado de baixa intensidade de impedir a reabsorção óssea.

Tais resultados, que evidenciem a ação do US pulsado de baixa intensidade evitando a osteopenia, ainda não foram demonstrados na literatura, apenas a utilização do US em osteoporose de ratas, onde também não foi encontrado efeito benéfico significativo do US

(SPADARO e ALBANESE, 1998; WARDEN, *et al.*, 2001a; CARVALHO e CLIQUET, 2003).

Os resultados estatisticamente não significativos do presente estudo discordam daqueles encontrados por Arai *et al.* (1993), que demonstraram efeitos anabólicos do US pulsado de baixa intensidade em pacientes osteoporóticos, sem fraturas. Muito provavelmente, tais efeitos se devem ao fato de ter sido um estudo de caso não controlado realizado com um número muito reduzido de pacientes (n=5).

Os nossos resultados também se opõem àqueles encontrados por CARVALHO e CLIQUET JR (2003) quanto a força máxima, mesmo tendo sido utilizado os mesmos parâmetros para o ultra-som, mas em tal estudo os animais que já apresentavam um quadro de osteoporose estabelecido.

Entretanto, nossos resultados concordam com os de SPADARO e ALBANESE (1998), que demonstraram a não influência do US pulsado de baixa intensidade em ossos longos de roedores em crescimento, por não observarem melhora da densidade mineral óssea de tais ossos. Porém, seus estudos foram realizados em ratos saudáveis e não com osteopenia induzida, que também discordaram dos resultados encontrados por WARDEN e colaboradores (2001a), sendo portanto resultados limitados quanto à avaliação do US sobre a osteoporose.

No nosso estudo, o US pulsado de baixa intensidade foi utilizado devido à sua atuação positiva comprovada sobre a regeneração óssea em casos de fraturas, onde seus efeitos estão melhor estabelecidos, pois o osso responde à ação de cargas mecânicas devido à sua propriedade piezoelétrica, remodelando assim o osso fraturado. A atuação benéfica do US em fraturas ósseas deve-se principalmente ao fato de que o US sendo uma onda de compressão que gera correntes de velocidades altas que originam forças de cisalhamento nas

membranas celulares, altera o transporte e conseqüentemente a concentração de íons no interior das células, com mudanças da resposta celular, levando ao reparo das fraturas.

Este efeito também pode ser observado em estudos com US no reparo de fraturas ocorridas em ossos osteoporóticos, confirmando sua atuação na consolidação de fraturas.

Também, a atuação do US no reparo de fratura é comprovada por sua ação sobre o sistema vascular local e conseqüentes mudanças da concentração de nutrientes e metabólitos, acelerando o processo de reparo ósseo (XAVIER e DUARTE, 1983).

O fato de sua atuação influenciar o reparo ósseo e não o remodelamento ósseo, deve estar baseado nas propriedades acústicas do osso, que quando intacto atenua a energia do ultra-som, sendo insuficiente para induzir mudanças das propriedades estruturais e materiais do osso, como também na intensidade e freqüência do US utilizado. Mas, quando fraturado, sua integridade comprometida diminui a atenuação ao US, então este atua em camadas mais internas do volume ósseo estimulando a osteogênese (WARDEN, *et al.*, 2001a).

Possivelmente em nosso estudo, onde a osteopenia ainda não se caracterizava, como era nosso objetivo, já que se iniciou a estimulação ultrassônica 24 horas após a ovariectomia, o efeito não positivo esteja também relacionado à intensidade e freqüência do US utilizado. Estudos anteriores sugerem a necessidade de utilização de intensidades e freqüências maiores, já que a atenuação óssea característica, consideraria freqüências menores como força estática, não respondendo satisfatoriamente, pois o osso responde preferencialmente a cargas dinâmicas (TURNER, 1998).

Quanto ao tempo de estimulação, os resultados não demonstraram diferenças significativas quanto a perda óssea, que impedissem portanto a osteopenia, sugerindo ainda um possível efeito deletério com 30 minutos de estimulação.

Há também que se considerar, quanto a consolidação de fraturas, estudos anteriores realizados com ultra-som terapêutico de 1MHz, isto é, aquele com intensidades aplicadas na prática clínica fisioterapêutica, com intensidade entre $0,03 \text{ w/cm}^2$ (SATA) a $0,5 \text{ w/cm}^2$, demonstraram eficácia em induzir a osteogênese e promover o reparo e/ou regeneração de fraturas e prevenir a não união óssea. Estudos na tentativa de otimização dos parâmetros deste tipo de ultra-som demonstram também que intensidades acima de $0,5 \text{ w/cm}^2$ podem resultar em efeitos deletérios ao processo de reparo ósseo (REHER *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2001; HARLE *et al.*, 2001; LYON; LIU; MÉIER, 2003).

Porém estes estudos são focados na regeneração óssea de fraturas. Não existem ainda, relatos na literatura do uso de tal faixa de intensidades do US terapêutico em osteoporose e osteopenia.

Também a não atuação positiva do US impedindo a perda óssea no corrente estudo deve ter sua explicação baseada no mecanismo biofísico da ação do ultra-som, porém este mecanismo ainda não foi descrito na literatura.

Portanto há a necessidade de novas investigações no sentido de otimizar a utilização do US quanto à intensidade e frequências que não só promovam o reparo de fraturas resultantes da fragilidade óssea característica da osteoporose, mas também atuem na prevenção desta perda óssea, isto é, na osteopenia.

6 CONCLUSÕES

O ultra-som pulsado de baixa intensidade na frequência e intensidade utilizadas não resultou em mudanças que evitassem a perda óssea característica em ratas ovariectomizadas.

A ovariectomia resultou em osteopenia dos animais analisados.

Os tempos de 20 e 30 minutos diários de estimulação ultrassônica não resultaram em efeito positivo do US impedindo a osteopenia induzida pela ovariectomia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTIN, L. M. Efeito do ultra-som no reparo de falha óssea experimental – avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 8, n 1, p. 1-6, 2004.

ANDREASSEN, T.T.; MELSEN, F.; OXLUND, H. The influence of growth hormone on cancellous and cortical bone of the vertebral body in aged rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, p. 1094-1102, 1996.

ARAI, T. et al. The effect of ultrasound stimulation on disuse osteoporosis. **Thirteenth Annual Meeting of Bioelectrical Repair and Growth Society**, n 13, p. 17, 1993.

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: Biophysical effects. **Physical Therapy**, v. 81, n 7, p 1351-1358, 2001.

BERTONCELLO, D. **Efeitos da pinealectomia sobre o tecido ósseo de ratos intactos e orquiectomizados**. 2005. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

BERTONCELLO, D. **Efeitos do tratamento com melatonina sobre o tecido ósseo de ratos castrados**. 2001. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

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

CALLISTER JR., W. D.; WILEY, W. D. Mechanical properties of metals. In: **Materials science and engineering – an introduction**. Cap. 6. 1994.

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

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

CARNEIRO, R. A. Osteoporose primária. In: COSSERMELLI, W. **Terapêutica em reumatologia**. 1 ed. Lemos Editorial. Cap. 116, p. 1035-1045, 2000.

CARVALHO, D.C.L , CARVALHO, M.M., CLIQUET JUNIOR, A. Osteoporose por desuso: aplicação na reabilitação do lesado medular. **Acta Ortopédica Brasileira** v. 9, n. 3, p. 34-43, 2001.

CARVALHO, D.C.L , CLIQUET JUNIOR, A. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. **Acta Ortopédica Brasileira**., v. 11, n 1, p. 17-24, 2003.

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

CHIVERS, R.C. Fundamentals of ultrasonic propagation. In: Preston R.C. **Output Measurements for Medical Ultrasound**. London: Springer-Verlag, p.19-33, 1991.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, **The American Journal of Medicine**, v.90, p. 107-110, jan.,1991.

CORRADI, C.; COZZOLINO, A. Ultrasound and bone callus formation during function. **Archives of Orthopaedic.**, v. 66, p. 77-98, 1953.

CORRADI, C.; COZZOLINO, A. The action of ultrasound on the evolution of an experimental fracture in rabbits. **Minerva Orthopaedic**, v. 55, p. 44-45, 1952.

COXAM, V, et al. Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats. **Bone**, v. 19, p. 107-114, 1996.

DANIELSEN, C. C.; MOSEKILDE, L.; ANDREASSEN, T.T. Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. **Calcified Tissue International**, v, 50, p. 169-174, 1992.

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

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

DEMPSTER, D.W. et al. Temporal changes in cancellous bone structure of rats after ovariectomy. **Bone**, v. 16, p. 157-161, 1995.

DINNO, M. A. et al. 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. 1543-1552, 1989.

DIONÍSIO, V. C. **O efeito do ultra-som terapêutico na vascularização pós lesão muscular experimental em coelhos**. 1998. 51f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia , Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

DOAN, N. et al. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**., v. 57, p. 409-419, 1999.

DOCKER, M. F. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, n 4, p 154-155, 1987.

DODDS, R. A.; ALI, N.; PEAD, M. J.; LANYON, L. E. Early loading-related changes in activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblast_in rat fibulae in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**. 8, p. 261-267, 1993.

DUARTE, L. R. The stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.**, v.101, n. 153-159, 1983.

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

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

DUPAS, M. A. **Pesquisando e Normalizando – Noções Básicas e Recomendações Úteis para a Elaboração de Trabalhos Científicos**. São Carlos: EdUFSCar, 2004.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, n. 3, p. 116-120, 1987.

DYSON, M.; BROKES, M. Stimulation of bone repair by ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 2, p. 61-66, 1983.

DYSON, M.; SUCKLING, J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey the mechanism involved. **Physiotherapy**, v. 64, n. 4, p. 105-108, 1978.

EINHORN, T. A. Bone strength: the bottom line. **Calcified Tissue International**, v. 51, p. 333-339, 1992.

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

EINHORN, T. A. 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. 1996 b.

ERIKSEN, E. F.; AXELROD, D. W.; MELSEN, F. **Bone Histomorphometry**. Raven Press. New York, 1994.

FAGANELO, F. R.; CARVALHO, D. C. L. **Ação do ultra-som sobre fraturas de ratas osteopênicas**. São Carlos: UFSCar/ Fisioterapia, 1999. Trabalho de Conclusão de Curso.

FRANKEL, V. H. Results of prescription use of pulse ultrasound therapy in fracture management. *Surgical Technology Internacional VII - Orthopaedic Surgery*, p. 389-393, 1998.

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

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

GLASER, P. A. et al. Use of ultrasound in spinal arthrodesis. A rabbit model. **Spine**, v. 23, n. 10, p. 1142-1148, 1998.

GOODSHIP, A. E.; LANYON, L.E. ; McFIE, H. Functional adaptation of bone to increased stress. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 61A, p. 539-546, 1979.

GUERINO, M. R. et al. Aplicação do ultra-som pulsado terapêutico sobre a resistência mecânica na osteotomia experimental. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.2, n. 2, p. 63-66, 1997

HADJIARGYROU, M. et al. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, n. 355S, p. 216-229, 1998.

HARGENS, A. Recent bed-rest results and countermeasure development at NASA. **Acta Physiologic Scandinavica** V. 150, p. 103-114, 1994.

HARLE, J. et al. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells *in vitro*. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 4, p. 579-586, 2001.

HECKMAN, J. D. et al. 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, 1994.

HEKKENBERG, R. T.; OOSTERBAAN, W. A. Evaluation of ultrasound therapy devices TNO-test, radiation safety and dose accuracy often leave something to desired. **Physiotherapie**, v. 96, n. 5, p. 112-117, 1985.

HOGAN, H. A.; RUHMANN, S.P.; SAMPSON, H.W. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 2, p. 284-292, 2000.

HOGAN, R. D.; BURKE, K. M.; FRANKLIN, T. D. The effect of ultrasound on microvascular hemodynamics in skeletal muscle: effects during ischemia. **Microvascular Research**, v. 23, p. 370-379, 1982.

HOOGLAND, R. Terapia ultrasonica . **Enraf-Nonius**, p. 5-35, 1986.

HOU, J. C. et al. Structural and mechanical adaptations of immature trabecular bone to strenuous exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, n. 4, p. 1309-1314, 1990.

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

ITO, M. et al. 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. 161-166, 2000.

JINGUSHI, S. et al. Effects of non-invasive pulsed low-intensity ultrasound on rat femoral fracture. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 83-A, n. 2, p. 259-270, 1998.

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

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

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

KANH, J. **Ultrasound in Principles and Practice of Electrotherapy**, Churchill Livingstone, NY, 2^a ed., cap. 4, p. 51-70, 1991.

KANIS, J. A. et al. The diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research.**, v. 9, n. 8, p. 1137-1141, 1994.

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

KOKUBO, T. et al. 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. 284-287, 1999.

KREMKAU, F. W. Physical considerations. In: NYBORG, L. N.; ZISKIN, M. C. **Biological Effects of Ultrasound**. New York. Churchill Livingstone. Cap. 2, p. 9-21, 1985.

KRISTIANSEN, T. K. et al. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific low-intensity ultrasound. **The Journal Bone and Joint Surgery Am.** , v. 79, n. 7, p. 961-973, 1997.

LEHMANN, J. F.; HERRIK, J. F. Biologic reactions to cavitation a consideration for ultrasound therapy. **Archives of Physical Medicine**, v. 3, p. 86-98, 1953.

LEHMANN, J. F.; GUY, A. W. Ultrasound therapy. In: REID, J.; SIKOV, M. **Interaction of ultrasound and biological tissues**. Washington, DHEW Publication, p. 114-152, 1972.

LI, J. K. et al. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. **Biomaterials**, v. 24, p. 2379-2380, 2003.

LOW, J. REED, A. **Eletroterapia explicada-Princípios e prática**, 3^a ed., São Paulo: Manole, 2001.

LYON, R.; LIU, X. C.; MEIER, J. The effects of therapeutic vs high-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 865-871, 2003.

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

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021-1029, 1990.

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

MAYR, E. et al. Does low intensity pulsed ultrasound speed healing of scaphoid fractures?. **Handchir Mikrochir Plast Chir**, v. 32, n. 2, p. 115-122, 2000.

McDIARMID, T.; BURNS, P. N. Clinical applications of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, n. 4, p. 155-162, 1987.

MENEZES, D. F.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Aplicação do ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 4, n.1, p. 27-31, 1999.

MEUNIER, P. J. **Bone Histomorphometry. Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management**. 2^a Ed. Lippincott-Raven publishers. Philadelphia. P. 299-318, 1995.

MILLER, S. C.; BOWMAN, B. M.; JEE, W. S. S. Available animal models of osteopenia-small and large. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 117-123, 1995.

MOSEKILDE, L.; DANIELSEN, C.C.; KNUDSEN, V.B. The effect of aging and ovariectomy on vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. **Bone**, v. 14, p.1-6, 1993.

MOSEKILDE, L. et al. PTH has more pronounced effect on vertebral bone mass and biomechanical competence than antiresorptive agents (estrogen and biphosphonate) – assessed in sexually mature, ovariectomized rats. **Bone**, v. 15, p. 401-408, 1994.

MOSEKILDE, L. Assessing bone quality animal models in preclinical osteoporosis research. **Bone**, v. 14, p. 342-352, 1995.

MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J. S.; McOSKER, J. E. No loss of biomechanical effects after withdrawal of short-term PTH treatment in aged, osteopenic, ovariectomized rat model. **Bone**, v. 20, n. 5, p. 429-437, 1997.

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

NARUSE, K. et al. Anabolic response of mouse-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 268, p. 216-220, 2000.

NOLTE, P. A. et al. Low intensity ultrasound stimulates in vitro endochondral ossification. **Calcified Tissue International**, v. 64, n. 1, p. S62, 1999.

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

OXLUND, B. S. et al. 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, 2003.

PARFITT, A. M. The quantum concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 28, n. 1, p. 1-5, 1979.

PARFITT, A. M.; CHIR, M.B.B. Bone remodeling and bone loss: understanding the physiology of osteoporosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 30, p. 789-811, 1987

PARFITT, A. M. et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595-610, 1987 .

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

PEAD, M.J.; LANYON, L.E. Indomethacin modulation of load-related stimulation of new bone formation in vivo. **Calcified Tissue International**, v. 45, p. 34-40, 1989.

PEAD, M.J. et al. Increased ^3H uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. **Calcified Tissue International**. v. 43, p. 92-96, 1988.

PENG, Z. et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PILLA, A. A. et al. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. **Journal of Orthopaedic and Trauma**, v. 4, n. 3, p. 246-253, 1990.

PINTO NETO, A. M. et al. Concenso brasileiro de osteoporose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, p. 343-354, 2002.

QUEIROZ, E. S. C. **Efeito do óxido nítrico sobre a osteopenia induzida pela castração em ratos**. 2002. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

RAISZ, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8B, p. 1353-1358, 1999.

REHER, P. et al. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 23, p. 1251-1258, 1997.

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

ROBINSON, T. et al. Gymnasts exhibit higher bone mass than runners despite similar prevalence of amenorrhea and oligomenorrhea. **Journal of Bone and Mineral Research**. V. 10, p.26-35, 1995.

SCHORTINGHUIS, et al. Ultrasound to stimulate mandibular bone defect healing: a placebo-controlled single-blind study in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 194-201, 2004.

SEDLIN, E. D. A rheologic model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, S. 83, 1965.

SEEMAN, E.; EISMAN, J. A. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. **The Medical Journal of Australia**, v. 180, p. 298-303, 2004.

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

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

SHIMAZAKI, A. et al. 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.1077-1082, 2000.

SIMMONS S. et al. Space flight and non-weight bearing bones of the rats skeleton. **27th Orthopaedic Research Society**, v. 6, p. 65, 1981.

SMITH, N. B. et al. Thermal effects of focused. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 10, p. 1427-1433, 2001.

SNOW-HARTER, C. et al. Effects of resistance and endurance exercise on bone mineral status of young women: a randomized exercise intervention trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, V.7, p. 761-769, 1992.

SOGAARD, C. H. et al. Long-term exercise of young and adult female rats: Effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. **Journal of Bone and Mineral Research**, V. 9, p. 409-416, 1994.

SOUZA, S. A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**, Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo – Brasil, 1974.

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

SUN, J. S. et al. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells, **Journal of Biomedical Mater Research.**, v. 57, n. 5, p. 449-456, 2001.

SUN, J. S. et al. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. **Journal of Biomedical Mater Research**, v. 46, n. 2,p. 253-261, 1999.

TAKIKAWA, S. et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rats nonunion fracture model. **Journal of Ultrasound Medicine**, v. 20, p. 197-205, 2001.

TANZER, M.; KANTOR, S.; BODYN, J. D. Enhancement of bone growth into porous intramedullary using non-invasive low-intensity ultrasound. **Journal Orthopaedic Research**, v. 9-19, p. 195-199, 2001.

Ter HAAR, G. Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, p. 110-113, 1987.

THOMPSON, D.D. et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 125S-133S, 1995.

TUREK, S. L. **Ortopedia: princípios e sua aplicação**. 4ª ed São Paulo,. Manole Ltda., V. 1. p. 31-107, 1991.

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

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

VÄÄNÄNEN, H. K. Patogenesis of osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 49, p. 11-14, 1991.

WANG, S. et al. Low-intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral model. **Journal Orthopaedic Research**, v. 12, n. 1, p. 40-47, 1994.

WARDEN, S. J. et al. Acceleration of fresh fracture repair using the sonic accelerated fracture healing system (SAFHS): A review. **Calcified Tissue International**, v. 66, p. 157-163, 2000.

WARDEN, S. J. et al. Skeletal effects of low-intensity pulsed ultrasound on the ovariectomized rodent. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, p. 989-998, 2001 a.

WARDEN, S. J. et al. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. **Bone**, v. 29, n. 5, p.431-436, 2001 b.

WARDEN, S. J. et al. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. **Physical Therapy**, v. 86, n. 8, p.1118-1127, 2006.

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

WILLIAMS, R. **Ultrasound : biological effects and potential hazards**. 2^a ed. London . Academic Press, 1983.

WIMALAWANSA, S. J. Prevention and treatment of osteoporosis: efficacy of combination of hormone replacement therapy with other antiresorptive agents. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 3, n. 2, p. 187-201, 2000.

WIMALAWANSA, S. J. Therapeutic options in prevention and treatment of osteoporosis.

Experimental and Clinical Endocrinology, v. 12, p. 1-27, 1993.

WOLFF, J. **The law of bone remodeling**. Traduzido por Maquet, P; Furlong, R. New York, Springer, 1986.

WOOLF, A. D.; DIXON, A. S. J. **Um guia clínico – Osteoporose**. London: Martin Dunitz, 1988.

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

WRONSKI, T. J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcified Tissue International**, v. 45, p. 360-366, 1989.

WRONSKI, T. J.; YEN, C-F. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. **Cells Mater** suplemento 1, p. 69-74, 1991.

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

YOUNG, S. Terapia por ultra-som. In: Kitchen, S.; Bazin, S. **Eletroterapia de Clayton**, 10ª ed. São Paulo: Editora Manole. Cap. 15, p. 235-258, 1996.

ZARROW, M. X. et al. **Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques.**

New York: Academic Press, p. 136-137, 1964.