

Efeitos da remobilização por meio de exercício físico sobre a densidade óssea de ratos adultos e idosos

Physical exercise remobilization effects on bone density in adults and elderly rats

Guilherme Akio Tamura Ozaki,¹ Tatiana Emy Koike,¹ Robson Chacon Castoldi,^{1,2,3*} André Augusto Baldacin Garçon,¹ Fábio Yoshikazu Kodama,¹ Adriana Yukie Watanabe,¹ Aldo Eloizo Job,¹ Mário Jefferson Quirino Louzada,¹ Regina Celi Trindade Camargo,¹ José Carlos Silva Camargo Filho¹

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

A presente pesquisa visou estudar os efeitos da remobilização por meio de exercício físico sobre o tecido ósseo de ratos adultos e idosos. Foram utilizados 80 ratos Wistar machos divididos em dois grupos, com idade de cinco meses para adultos e 15 meses para idosos; subdivididos em quatro subgrupos cada: grupo controle (G1 e G5), grupo imobilizado (G2 e G6), grupo remobilizado livre (G3 e G7), grupo remobilizado por meio de exercício físico (G4 e G8). Os grupos imobilizados foram eutanasiados logo após a retirada da imobilização gessada, que perdurou por 14 dias. Os grupos remobilizados livre permaneceram por sete dias em gaiolas coletivas após a retirada da imobilização, seguidos por eutanásia. Os grupos exercitados realizaram natação por 25 minutos/dia, durante sete dias, sendo posteriormente eutanasiados. Foi possível observar que os grupos remobilizados G3/G7 e G4/G8, tiveram um aumento da massa óssea em comparação ao G1/G5 e aos G2/G6. Com relação à análise mecânica, no grupo adulto houve significância estatística quando comparados a G2 e G3. A imobilização promoveu a redução da densidade mineral óssea e propriedades mecânicas, fato que ocorreu de forma inversa na remobilização.

Palavras-chave: imobilização, exercício físico, natação, densidade óssea

ABSTRACT

This study aimed to analyze the effects of remobilization by means of physical exercise on bone tissue in rats and elderly adults. A total of 80 male Wistar rats were split into two groups, aged five months to 15 months for adults and elderly; each one was further split into 4 subgroups: control (G1 and G5), immobilized groups (G2 and G6), remobilized groups free (G3 and G7), remobilized groups through exercise (G4 and G8). The immobilized groups were euthanized immediately after removal of immobilization, which lasted for 14 days. The remobilized groups remained free for seven days in collective cages after removal immobilization, followed by euthanasia. The exercise groups underwent swimming for 25 min/day during 7 days and then were euthanized. It was observed that groups remobilized G3/G7 and G4/G8, had an increase in bone mass compared to the G1/G5 and G2/G6. With respect to mechanical analysis, in the adult group was statistically significance when compared G2 and G3. The immobilization process caused a reduction in the bone mineral density, likewise reducing their mechanical properties.

Keywords: immobilization, exercise, swimming, bone density

Artigo recebido a 21.05.2013; 1ª Revisão 03.09.2013; 2ª Revisão 28.01.2014; Aceite 12.02.2014

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, Brasil

² Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, Brasil

³ Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, Brasil

* Autor correspondente: Rua Roberto Simonsen, 305, Bairro Centro Educacional, CEP: 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brasil; E-mail: castoldi_rc@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O tratamento de fraturas ósseas, bem como doenças degenerativas ou articulares, pode exigir cirurgia ou tratamento conservador com subsequente imobilização dos membros (Konno et al., 2008). Entretanto, longos períodos de imobilização conduzem à perda óssea e de propriedades do osso (Bertolini, Oliveira & Cararo, 2010).

O tecido ósseo é constituído por um tecido conjuntivo especial, diferindo de outros materiais estruturais pelo fato de ser autorreparador, podendo alterar suas propriedades e geometria em resposta às mudanças na demanda mecânica (Turner, 2000). A falta de sustentação de peso e de atividade física levam à diminuição no estímulo mecânico necessário para crescimento e remodelamento ósseo, que pode resultar na ocorrência da osteoporose e possibilitar fraturas (Esteves et al., 2010).

Com relação ao envelhecimento sabe-se que é caracterizado por uma diminuição funcional dos tecidos, órgãos e sistemas do organismo, com redução da capacidade de adaptação a estímulos internos e externos (Figueiredo, Ferreira, Appell & Duarte, 2008). Devido à maturação e envelhecimento do tecido ósseo, muitas mudanças podem ser observadas como a diminuição da deformação plástica e o acúmulo de microdanos, o que tem um efeito na propriedade do tecido ósseo e no risco de fratura (Burr, 2002). Além disso, as alterações provocadas pelo processo de senescência sobre estes tecidos podem resultar em maior suscetibilidade a lesões, sendo assim, a eleição do protocolo de reabilitação deve ser cautelosa. Nesse sentido, a adequação de um método de tratamento que possa ser efetivo no tecido ósseo é de suma importância no período pós-clínico.

A utilização do exercício físico pode ser um meio efetivo no aumento da massa óssea e assim minimizar os efeitos deletérios da imobilização. Dessa forma, a presente pesquisa visou estudar os efeitos da imobilização e remobilização sobre o tecido ósseo de ratos adultos e idosos.

MÉTODO

Amostra

Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia, Mammalia*), provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, e alocados no Biotério da FCT/UNESP (Campus de Presidente Prudente) mantidos durante todo o experimento, dispostos em gaiolas plásticas coletivas de dimensão 30 × 16 × 19 cm contendo, no máximo, 5 animais em cada. Foram mantidos sob temperatura média de 22 ± 2°C, humidade relativa a 60%, ciclo claro/escuro de 12 horas, com início do ciclo claro às 7:00 horas, alimentação padrão para roedores e água fornecidas *ad libitum*. Os animais foram divididos em 8 grupos em função das variáveis independentes (Tabela 1).

Os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente sob o protocolo nº 312/2008, seguindo os princípios éticos na experimentação animal (COBEA). Devido a modificações no projeto original e na instituição do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente no ano de 2010, este projeto foi reenaminhado e aprovado (protocolo nº 05/2010).

Tabela 1
Descrição dos Grupos Experimentais (n = 80)

Grupo	Descrição
G1	Adulto Controle
G2	Adulto Imobilizado
G3	Adulto Imobilizado e Remobilizado Livre
G4	Adulto Imobilizado e Remobilizado por meio de exercício físico
G5	Idoso Controle
G6	Idoso Imobilizado
G7	Idoso Imobilizado e Remobilizado Livre
G8	Idoso Imobilizado e Remobilizado por meio de exercício físico

Instrumentos e Procedimentos

Protocolo de Imobilização

Para a imobilização, os animais foram anestesiados pela injeção da associação de dois anestésicos, cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg), via intraperitoneal (Matheus, Gomide, Oliveira, Volpon & Shimano, 2007). Confirmada a anestesia, eles tiveram os tornozelos envolvidos por uma malha tubular, sendo em seguida utilizada uma atadura gessada de secagem rápida com aproximadamente três centímetros de largura, aplicada de maneira convencional para a imobilização dos membros posteriores, desde a pele até o tornozelo (Figura 1). O gesso foi substituído quando necessário, respeitando o mesmo procedimento.

A imobilização foi realizada bilateralmente, com ambos os membros posteriores (pele, quadril e joelho) em extensão e o tornozelo em flexão plantar, a fim de manter o músculo gastrocnêmio em posição de encurtamento.

Os animais permaneceram imobilizados por sete dias consecutivos, mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração. Anteriormente à aplicação da técnica de imobilização gessada os animais dos grupos G4 e G8, foram submetidos a um processo de adaptação ao meio líquido durante 15 minutos por 10 dias consecutivos (Figura 1), a fim de reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do exercício físico (Camargo Filho et al, 2006; Mancha-

do, Gobatto, Cortarteze, Papoti, & Mello, 2006).

Após a retirada da imobilização, os animais dos grupos G3 e G6 foram mantidos em gaiolas coletivas para remobilização livre, permanecendo no biotério por período de sete dias, sendo posteriormente eutanasiados. Os animais dos grupos G4 e G8 também foram submetidos ao mesmo procedimento, porém por período de dois dias, antes da aplicação do protocolo de exercício físico.

Protocolo de exercício

Utilizou-se um tanque (Figura 1) contendo 8 tubos cilíndricos com 25 cm de diâmetro e 100 cm de profundidade, contendo no máximo 70 cm de água a $31 \pm 1^\circ\text{C}$, de modo que os animais não conseguiram apoiar a extremidade da cauda no fundo do tanque (Manchado et al., 2006).

Após dois dias de remobilização livre, os animais dos subgrupos G4 e G8 foram submetidos a cinco sessões (diárias) individuais de natação com duração de 25 minutos nas mesmas condições da adaptação sem adição de carga nos animais.

Coleta e preparo do material

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de superdosagem da associação de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina via intraperitoneal, seguindo os princípios éticos em pesquisa animal.

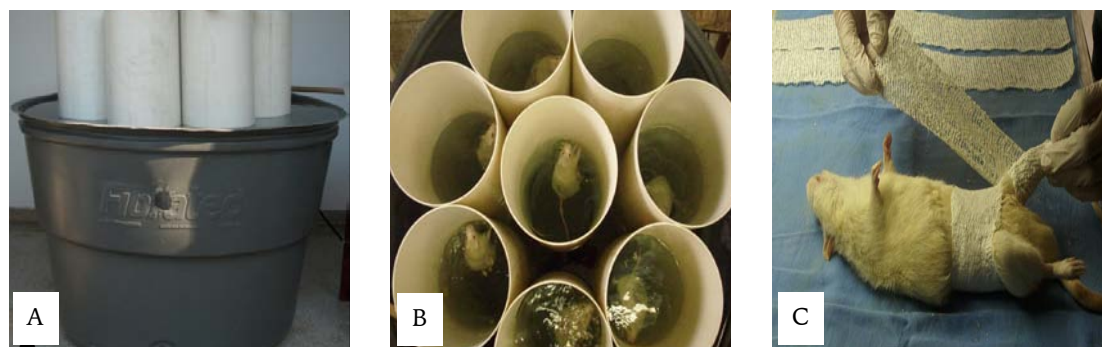


Figura 1. Vista lateral (A) e superior (B) do tanque, e (C) processo de imobilização engessada de membro inferior e quadril utilizados no presente estudo

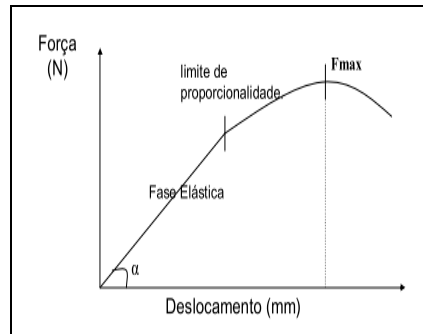


Figura 2. Tíbia posicionada em pré-teste na EMIC[®] para realização de ensaio mecânico e resistência durante a sua execução

Após a eutanásia, a tíbia direita foi retirada por meio de incisão longitudinal com remoção da pele e de partes moles, deixando o osso sem revestimento dos tecidos à temperatura de -20°C para posterior realização da análise da densitometria óssea e ensaio mecânico de flexão em três pontos.

Densitometria óssea

As tíbias armazenadas foram submetidas à análise de densitometria em aparelho densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA), modelo DPX-Alpha, Lunar Corporation[®], Madison, Wis, pertencente à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, utilizando-se um *software* especial desenvolvido para pequenos animais (Apolinário, Coelho & Louzada, 2011).

Os ossos foram submersos num recipiente de plástico contendo 2 cm de profundidade de água para simular tecido mole (*in vivo*). O terço médio da tíbia foi delimitado pelo aparelho, sendo essa área percorrida pelo DXA (5 cm \times 4 cm). O laser do densitômetro foi ajustado acima do centro do osso onde se iniciou a captura da imagem.

Após a captura das imagens os ossos foram analisados utilizando-se a ferramenta de análise manual. A área desejada para análise foi delimitada na região do terço médio da diáfise da tíbia e esta foi contornada para obtenção dos valores de conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea.

Ensaio mecânico

O ensaio mecânico de flexão a três pontos em cada tíbia foi realizado por meio de uma máquina universal de ensaios mecânicos EMIC[®] 2000, que pertence ao Departamento de Física, Química e Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente – FCT/UNESP, dotada de célula de carga de 50 kgf ajustada para a escala de 20 kgf.

O dispositivo para ensaio de flexão a três pontos é constituído por dois apoios com perfil circular de 3.5 mm de diâmetro situados na base da máquina e equidistantes 20 mm e um atuador ou cutelo posicionado entre os apoios, com a mesma forma e dimensão dos apoios, acoplado à parte móvel da máquina de ensaio por meio de célula de carga. A tíbia foi posicionada de forma que o ponto de referência medido ficasse alinhado com o atuador, com velocidade de descida de 5 milímetros/minuto (Figura 2).

O osso foi ajustado de tal forma a não se deslocar durante o ensaio, tendo uma pré-carga inicial nula. O ensaio prosseguiu, sendo que as cargas aplicadas foram monitoradas até o momento onde houve a ruptura do tecido ósseo. A partir de então foram obtidos valores de força máxima e deformação. Os parâmetros analisados foram força e tensão máxima necessária para provocar a deflexão ou deformação medida na região do atuador e provocar a fratura óssea (Léo, Cunha, Oliveira & Prado, 2012).

Análise Estatística

Para análise estatística foram feitos cálculos de média e desvio padrão. Foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar a presença ou ausência de distribuição Gaussiana. Após a constatação da distribuição normal dos dados, foram usadas as análises paramétricas. Para verificação de diferenças entre as variáveis dos diferentes grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA *one way*) com o teste *post hoc* de Tukey. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

A mensuração da massa óssea foi realizada logo após a coleta do material. Esses dados permitem a verificação das alterações da massa óssea após o período de aplicação dos protocolos de imobilização e de remobilização nos grupos adultos G2, G3 e G4 e idosos G6, G7 e G8 (Figura 3).

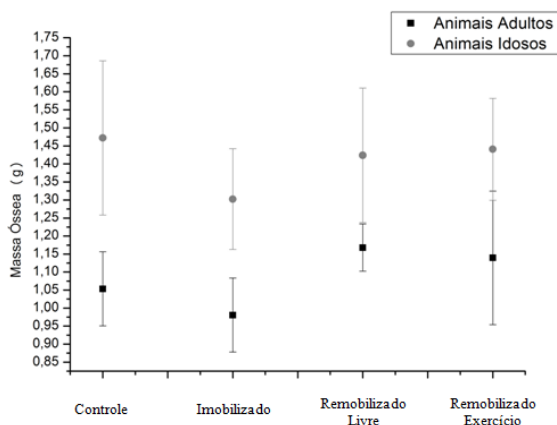


Figura 3. Análise da massa óssea nos diferentes grupos de animais

Foi observado um aumento na massa óssea dos animais adultos submetidos ao protocolo de remobilização, tanto livre (G3), quanto por meio de exercício físico (G4). Esse aumento elevou a massa óssea para valores acima do grupo controle. Porém nos animais idosos o aumento da massa óssea só ocorreu até os níveis observados nos animais do grupo controle.

Os valores observados a partir das análises da densidade mineral óssea demonstram que os animais remobilizados, apresentaram valores próximos do grupo controle, evidenciando que houve uma recuperação da densidade mineral óssea após a imobilização (Tabela 2). Nota-se diferença estatisticamente significativa na F-Max entre os grupos adultos imobilizados (G2) e remobilizados livre (G3). Nos grupos idosos foi verificada diferença significativa entre os grupos controle (G5), imobilizados (G6), remobilizados livre (G7) quando comparados ao grupo remobilizado por meio de exercício físico (G8).

DISCUSSÃO

O presente estudo verificou os efeitos da imobilização e remobilização por meio do exercício físico (natação) no tecido ósseo. Sendo avaliados estes efeitos por meio da mensuração da massa óssea, densitometria óssea e ensaio mecânico. Foi observado que houve aumento da massa óssea e das propriedades mecânicas ósseas favorável aos grupos submetidos ao exercício físico, demonstrando que este tipo de atividade tem capacidade de promover o aumento da resistência óssea.

Estudos mostram que a atividade física de baixa e moderada intensidade tem a capacidade de promover alterações no tecido ósseo, melhorando seus componentes, mesmo se executada por um curto período de tempo. Contudo, também é comprovado que a inatividade pode levar a uma perda relativa de massa óssea (Apolinário et al., 2011).

Foi possível observar no osso a diminuição de suas propriedades mecânicas nos animais submetidos ao processo de imobilização, tendo perdas significativas de sua deformação óssea, se comparados com o grupo remobilizado livre. A imobilização afeta diretamente os propriedades mecânicas que levam à síntese óssea. A ausência de estímulos sobre o tecido ósseo resulta na diminuição da deposição de cálcio, tornando-o mais frágil e enfraquecido. Portanto, o estímulo de sobrecarga é necessário para regular a resposta óssea local e, deste modo,

Tabela 2

Análise comparativa por grupos experimentais

Grupo	DXA (g/cm ²)	F-max (N)	Deformação (N/cm ²)
G1	0.20 ± 0.24	106.99 ± 20.63	0.92 ± 0.24
G2	0.18 ± 0.01	89.85 ± 17.65 ^a	0.72 ± 0.19
G3	0.20 ± 0.01	118.27 ± 14.83 ^b	1.25 ± 1.20
G4	0.20 ± 0.02	114.56 ± 18.19	0.97 ± 0.22
G5	0.24 ± 0.02	164.91 ± 30.58	0.71 ± 0.09 ^c
G6	0.23 ± 0.01	144.78 ± 26.07	0.82 ± 0.23 ^c
G7	0.23 ± 0.02	170.21 ± 34.95	0.81 ± 0.18 ^c
G8	0.25 ± 0.03	164.64 ± 51.45	1.24 ± 0.26

Nota: ^a $p < 0.05$ (comparado com G3); ^b $p < 0.05$ (comparado com G2); ^c $p < 0.05$ (comparado com G8)

proporcionar uma melhor calcificação do tecido, crescimento e remodelamento (Vasconcelos & Santos-Júnior, 2010).

A perda de massa óssea torna o osso mais suscetível à fratura. Nesse sentido, todo tecido biológico tem necessidade de receber estímulos para promover adaptações e desenvolver-se, especialmente o osso, que é remodelado ao longo de toda a vida e tem a necessidade de estímulos mecânicos para favorecer seu desenvolvimento (Villafañe, Cleland & Fernández-de-las-Peñas, 2013).

Após a análise da densidade mineral óssea, foi verificado que não houve diferença entre os grupos de animais adultos e idosos. Tal fato pode ser justificado pelo curto período de imobilização, o qual foi insuficiente para promover perdas significativas. Estudos com maior período de imobilização são necessários para que haja uma diminuição significativa do conteúdo mineral ósseo e conseqüentemente avaliar a influência do exercício de natação na recuperação tecidual.

O equilíbrio entre a reabsorção e a formação de tecido ósseo é influenciado por diversos fatores, como nutrição, atividade hormonal, atividade física e outros (Hojan, Milecki & Leszczński, 2013). O impacto mecânico quando diminuído pelo desuso causado por condições sistêmicas ou locais, como a imobilização, leva a um processo de adaptação com aumento da reabsorção e conseqüente enfraquecimento

do tecido ósseo durante períodos mais longos, podendo caracterizar-se uma osteopenia (Apolinário et al., 2011). Nesse caso, o osso, assim como todos os outros tecidos, é adaptativo a condições impostas, e desenvolve sua estrutura e função por meio de forças mecânicas e demandas metabólicas. A deposição do cálcio é parcialmente regulada pela quantidade de carga que lhe foi imposta. Assim, quanto maior forem as forças aplicadas, maior a ativação dos osteoblastos, tornando-os mais resistentes (Esteves et al., 2010).

Ramos et al. (2012) observaram que ratos submetidos ao exercício de natação não apresentaram um aumento significativo das propriedades mecânicas. Porém, no estudo de Huang et al. (2010) foi verificado um comportamento das propriedades mecânicas semelhante às utilizadas no presente estudo, com alterações ocasionadas pela natação de baixa intensidade.

A natação é questionada por ser um modelo de exercício que não gera impacto e conseqüentemente não resulta em grandes alterações no tecido ósseo, inviabilizando muitas vezes o tratamento de doenças ósseas. No entanto, no presente estudo foi observado que apesar de não haver o aumento da massa, também não ocorreu a diminuição da mesma. Além disso, a deformação nos animais idosos apresentou melhora significativa (Kemper et al., 2009).

O presente estudo se limitou a investigar o efeito da remobilização por meio da natação como fator de recuperação de tecido ósseo. Sugere-se que sejam utilizados modelos diferentes de atividade física, como corrida em esteira rolante ou saltos com sobrecarga, que possam promover efeitos diferenciados dos expostos na presente pesquisa. Além disso, a utilização da suplementação alimentar pode vir a contribuir com a literatura, no sentido de induzir ao aumento das propriedades mecânicas do tecido ósseo e na sua densidade.

CONCLUSÕES

A imobilização resultou na diminuição da força máxima no grupo adulto. Nos animais idosos a imobilização promoveu redução na deformação óssea. Além disso, o exercício foi capaz de restaurá-la, podendo assim ser utilizado como meio terapêutico na manutenção da massa óssea.

Agradecimentos:

Nada a declarar.

Conflito de Interesses:

Nada a declarar.

Financiamento:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; Pró-reitoria de Pós-graduação – PROPe e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/CNPQ.

REFERÊNCIAS

- Apolinário, J. C., Coelho, W. M. D., & Louzada, M. J. Q. L. (2011). Análise da influência do ultrassom de baixa intensidade na região de reparo ósseo em ratos sob ausência de carga. *Fisioterapia e Pesquisa*, 18(3), 275-279. doi: 10.1590/S1809-29502011000300013
- Bertolini, S. M., Oliveira, P. D., & Cararo, D. C. (2010). Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular. *Acta Scientiarum*, 32(1), 23-27. doi: 10.4025/actascihealthsci.v32i1.5908
- Burr, D.B. (2002). Bone material properties and mineral matrix contributions to fracture risk or age in women and men. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2(3), 201-204.
- Camargo Filho, J.C.S., Vanderlei, L.C.M., Camargo, R.C.T., Francischetti, F.A., Belangero, D.W., & Pai, V. D. (2006). Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: Estudo histológico, histoquímico e morfométrico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 12(5), 243-248. doi: 10.1590/S1517-86922006000500004
- Esteves, A. C., Bizarria, F. S., Coutinho, M. P., Barreto, T. K., Brasileiro-Santos, M. S., & Moraes, R. R. (2010). A natação minimiza o retardo no crescimento somático e ósseo de ratos? *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 16(5), 368-372. doi: 10.1590/S1517-86922010000500010
- Figueiredo, P.A., Ferreira, R.M., Appell, H.J., & Duarte, J.A. (2008). Age-induced morphological, biochemical, and functional alterations in isolated mitochondria from murine skeletal muscle. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, 63(4), 350-335.
- Hojan, K., Milecki, P., & Leszczyński, P. (2013). The impact of aerobic exercises on bone mineral density in breast cancer women during endocrine therapy. *Polish Orthopedics and Traumatology*, 78, 47-51. doi: 10.1590/S1517-8692201000500010
- Huang, T.H., Hsieh, S.S., Liu, S.H., Chang, F.L., Lin, S.C., & Yang, R.S. (2010). Swimming training increases the postyield energy of bone in young male rats. *Calcified Tissue International*, 86(2), 142-153. doi: 10.1007/s00223-009-9320-0
- Kemper, C., Oliveira, R. J. D., Bottaro, M., Moreno, R., Bezerra, L. M. A., Guido, M., & França, N. M. D. (2009). Efeitos da natação e do treinamento resistido na densidade mineral óssea de mulheres idosas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 15(1), 10-13. doi: 10.1590/S1517-86922009000100002
- Konno, E.A.B., Alves, E.P.B., Bertolini, G.R.F., Barbieri, C.E., & Mazzer, N. (2008). Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14(2), 122-125. doi: 10.1590/S1517-86922008000200008

- Léo, J. A., Cunha, A., Oliveira, E. F., & Prado, R. P., (2012). Efeito do laser de baixa potência (AsGa, 904 nm) na reparação óssea de fraturas em ratos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 47(2), 235-240. doi: 10.1590/S0102-36162012000200015
- Manchado, F. B., Gobatto, C. A., Contarteze, R. V. L., Papoti, M., & Mello, M. A. (2006). Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2(5), 259-262. doi: 10.1590/S1517-86922006000500007
- Matheus, J. P., Gomide, L. B., Oliveira, J. G. P., Volpon, J. B., & Shimano, A.C. (2007). Efeito da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 13(1), 55-59. doi: 10.1590/S1517-86922007000100013
- Ramos, S. P., Santos, V. B. C., Ruiz, R. J., Preti, M. C. P., Ventura, M. C., Nogueira, M. S., Campana, F. B., Müller, S. S., Polito, M. D., Siqueira, C. P. (2012). Efeito do treinamento físico e da ingestão crônica de cafeína sobre o tecido ósseo de ratos jovens. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, 26(2), 209-217.
- Turner, R. T. (2000). Invited review: What do we know about the effects of spaceflight on bone. *Journal of Applied Physiology*, 89(2), 840-847.
- Vasconcelos, A.P.T, & Santos-Júnior, F.F.U. (2010). Alterações na densidade óssea pós-imobilização em ratos. *Saúde em Diálogo*, 1(1), 59-65.
- Villafañe, J. H., Cleland, J. A., & Fernández-de-las-Peñas, C. (2013). The effectiveness of a manual therapy and exercise protocol in patients with thumb carpometacarpal osteoarthritis: A randomized controlled trial. *Journal Of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 43(4), 204-213. doi: 10.2519/jospt.2013.4524

