

**MARISTELA BORDINHON TIVERON**

**Estudo Clínico, Biomecânico e Histológico do Efeito da  
Menopausa Induzida por Ooforectomia no Tecido Ósseo.  
Modelo Experimental em Ratas.**

**Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina de Botucatu (UNESP) para  
obtenção do título de MESTRE em  
Bases Gerais da Cirurgia.**

**Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO SWAIN MÜLLER**

**Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Tiveron, Maristela Bordinhon.

Estudo clínico, biomecânico e histológico do efeito da menopausa induzida por ooforectomia no tecido ósseo: modelo experimental em ratas / Maristela Bordinhon Tiveron. – Botucatu : [s.n.], 2005.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Swain Müller

Assunto CAPES: 40102149

1. Cirurgia experimental. 2. Osteoporose. 3. Menopausa. 4. Rato como animal de laboratório.

CDD 616.71

Palavras chave: Biomecânica; Histomorfometria; Menopausa; Ooforectomia; Osteoporose.

*Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, com bênçãos e sabedoria. A sabedoria inferior é dada pelo quanto a pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.*

*Ao orientador, Prof. Dr. Sérgio Swain Müller, agradeço a paciência, compreensão, dedicação e as explicações que muito ajudaram no meu crescimento profissional e aumento dos meus conhecimentos, sem os quais, não teria conseguido concluir este mestrado.*

*Dedico este trabalho,*

*Aos meus filhos, Danilo e Larissa, concebida durante este estudo, que ficaram horas e dias sem minha presença;*

*Ao meu esposo, João, que muitas vezes supriu minha ausência junto aos meus filhos, principalmente a pequena Larissa;*

*Aos meus pais, Alcides (in memoriam) e em especial à minha mãe, Verginia, pelo apoio recebido ao longo deste mestrado e também por tudo de bom que me ensinaram em toda a minha vida.*

*Às minhas irmãs, Adalgisa e Miriam, que me apoiaram e me animaram para que eu não desistisse frente às dificuldades surgidas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que colaboraram na elaboração deste trabalho e em especial:

À Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela orientação na histomorfometria, auxílio e condições oferecidas pelo Laboratório do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu (UNESP);

Ao Prof. Dr. Rogério Dias, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) que muito colaborou, solucionou dúvidas, orientou e me atendeu sempre prontamente;

Ao Prof. Dr. Carlos Padovani do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu (UNESP) que gentilmente realizou as análises estatísticas com competência e prontidão;

À Sra. Maria Helena Spadot de Lima, Sr. Luis Carlos E. Bardella e Sra. Luzia Ferrari Galvea, técnicos do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela prontidão de seus serviços, simpatia no atendimento, trabalhos práticos realizados e cuidados com os animais;

Aos técnicos do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) pela confecção das lâminas;

À Sra. Elenize Jamas Pereira e Sr. José Carlos Georgetti, técnicos do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela utilização do analisador de imagens;

Às secretárias Solange Aparecida de Albuquerque Clara, Ana Claudia Albino e Roberta Ribeiro Magro, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) que sempre me atenderam com simpatia, presteza e gentileza;

Ao Sr. Carlos Luiz Miguel, técnico em informática do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela digitação, montagem e edição das tabelas e figuras, edição do texto e organização da aula da dissertação.

À Sra. Regina Célia Spadin e Sr. Nathanael Pinheiro Salles, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) que sempre me atenderam com boa vontade dando informações úteis e com muita simpatia;

Ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu (UNESP) pela orientação no procedimento cirúrgico;

Às amigas (os) e colegas de mestrado, fisioterapeutas Claudia Patrícia Martins Siqueira, Simone Angelino Silva, Afonso Shiguemi Salgado e Giancarlo Fellipe pela colaboração e cooperativismo;

À Enilze de Souza Nogueira Volpato, Diretora da Biblioteca do Campus de Botucatu (UNESP) e bibliotecárias, Luciana Pizzani e Rosemeire Aparecida Vicente pelo auxílio na revisão bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

A Professora Maria de Lourdes da Rosa Pereira, pela revisão do português.

## RESUMO

Com o objetivo de investigar as repercussões clínicas e as alterações biomecânicas e histológicas, no tecido ósseo, causadas pela menopausa induzida por ooforectomia, foram estudadas 64 ratas, adultas e virgens, *Rattus norvegicus albinus* (linhagem Wistar). Os animais foram divididos em dois grupos em relação ao tratamento: ooforectomia bilateral ou cirurgia placebo. O procedimento cirúrgico foi realizado aos quatro meses de idade. Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos, com 8 animais, segundo o tempo de pós-operatório no momento de sacrifício: três, seis, nove e 12 meses. Para o estudo clínico foi considerado o peso dos animais no momento do sacrifício. O estudo biomecânico foi realizado na tíbia direita por meio de ensaio de flexão em três pontos com velocidade de aplicação de carga de 30 mm/min, obtendo-se a carga máxima, na ruptura, e o coeficiente de rigidez, calculado a partir do diagrama carga-deformação. Para o estudo histológico, utilizou-se a tíbia esquerda (porção proximal) e análise de histomorfometria com o cálculo da área de trabéculas ósseas. A análise estatística do resultado do peso corpóreo e das propriedades mecânicas foi realizada pela técnica de análise de variância complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey; o estudo da área trabecular foi feito pela análise de variância não paramétrica. A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que a menopausa induzida pela ooforectomia bilateral causou aumento do peso corpóreo; redução da resistência do osso diafisário, ao seis meses de privação hormonal, mas este efeito foi igualado ao longo do tempo pelo envelhecimento do controle; a rigidez óssea foi menor no grupo ooforectomizado em todo o experimento; também foi constatada redução da massa óssea da região metafisária.



## ABSTRACT

In order to investigate the clinical consequences and the histological and biomechanical changes in the bony tissue, caused by menopause induced by oophorectomy, 64 adult and virgin rats, *Rattus norvegicus albinus* (Wistar lineage) were studied. The animals were divided into two groups regarding the treatment: bilateral oophorectomy or placebo surgery. The surgical procedure was carried out when they were four months old. Each group was subdivided into four other groups with eight animals according to the post operation time at the moment they were sacrificed: three, six, nine and 12 months. The animals' weight was taken at the moment they were sacrificed. The biomechanical study was carried out on the right tibia by bending test on three spots at the rate level of 30 mm/min, reaching maximum load at the rupture, and the stiffness coefficient assessed from the load-deformation curve. The left tibia was used for the histological study (proximal portion) for the analysis of histomorphometry (assessment of trabecular area). The analysis of the body weight result and the mechanical properties was carried out by two way ANOVA test; the study of the trabecular area was carried out by non parametric ANOVA test. The analysis of the results obtained allowed us to understand that the induced menopause by bilateral oophorectomy increased the body weight; reduced the diaphysis bone strength at the sixth month of lack of hormone but this effect was equaled after a while by the aging control; the bone stiffness was lower in the oophorectomized group throughout the experiment; it was also noticed bone mass reduction in the metaphysis region.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>Objetivo</b> .....	24
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	26
<b>2.1 – Animais de Experimentação</b> .....	26
<b>2.2 – Grupos Experimentais</b> .....	26
2.2.1 – Grupo A (Ooforectomia).....	26
2.2.2 – Grupo B (Cirurgia placebo).....	27
<b>2.3 – Fases do Experimento</b> .....	27
2.3.1 – Recepção e adaptação (1ª fase).....	28
2.3.2 – Momento 0 (2ª fase).....	28
2.3.3 – Momento 1 (3ª fase).....	28
2.3.4 – Momento 2 (4ª fase).....	28
2.3.5 – Momento 3 (5ª fase).....	28
2.3.6 – Momento 4 (6ª fase).....	28
<b>2.4 – Atributos Estudados</b> .....	29
2.4.1 – Peso corpóreo.....	29
2.4.2 – Propriedades mecânicas.....	29
2.4.3 – Histologia.....	29
<b>2.5 – Seqüência dos Tempos Experimentais</b> .....	29
2.5.1 – Seqüência dos tempos experimentais (1ª fase).....	29
2.5.2 – Seqüência dos tempos experimentais (2ª fase).....	30
2.5.3 – Seqüência dos tempos experimentais (3ª , 4ª, 5ª e 6ª fase).....	30
<b>2.6 – Técnicas Utilizadas</b> .....	31
2.6.1 – Manutenção.....	31
2.6.2 – Pesagem.....	31
2.6.3 – Anestesia.....	31
2.6.4 – Procedimento cirúrgico.....	31
2.6.5 – Sacrifício.....	32
2.6.6 – Obtenção das peças anatômicas (estudo biomecânico).....	32
2.6.7 – Obtenção das peças anatômicas (estudo histológico).....	32
2.6.8 – Estudo biomecânico.....	33

2.6.9 – Estudo histológico.....	34
2.6.10 – Análise estatística.....	35
2.7 – Material e Método (Figuras).....	36
<b>3. RESULTADO.....</b>	<b>42</b>
3.1 – Estudo Clínico.....	42
3.1.1 – Evolução.....	42
3.1.2 – Peso corpóreo.....	42
3.2 – Estudo Biomecânico.....	44
3.2.1 – Carga máxima.....	44
3.2.2 – Coeficiente de rigidez.....	46
3.3 – Estudo Histológico.....	48
3.3.1 – Histomorfometria.....	48
3.3.2 – Resultado (figuras).....	51
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
4.1 – Animal de Experimentação.....	58
4.2 – Modelo de Menopausa.....	58
4.3 – Delineamento.....	59
4.4 – Estudo Clínico.....	61
4.5 – Estudo Biomecânico.....	63
4.5.1 – Método de ensaio.....	63
4.5.2 – Carga máxima.....	68
4.5.3 – Coeficiente de rigidez.....	71
4.6 – Estudo Histológico.....	74
4.6.1 – Histomorfometria.....	74
4.7 – Considerações Finais.....	79
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A osteoporose pode ser definida como doença difusa do esqueleto caracterizada histopatologicamente pela redução absoluta da mineralização óssea, com conseqüente aumento do risco de fraturas após traumatismos mínimos. As principais manifestações clínicas nos seres humanos são as fraturas e complicações associadas (RIGGS & MELTON, 1986).

Osteoporose é, provavelmente, uma das raras condições clínicas não descrita por Hipócrates. Naquela época poucas mulheres sobreviviam até o período da menopausa e, portanto, não se observavam os efeitos das alterações hormonais e da idade no esqueleto humano (FIAT & MENDONÇA).

A osteoporose foi definida inicialmente por ALBRIGHT et al. (1940) como doença na qual há pouco osso, mas o que existe é normal. Hoje, mais de 60 anos depois, este conceito permanece válido. Os autores afirmaram, também, que a osteoporose aumenta o risco de fraturas em mulheres na menopausa, mas naquela época o papel do estrógeno era totalmente desconhecido (LINDSAY, 1993; TURNER et al., 1994).

Só a partir de 1970 a relação entre osteoporose e envelhecimento ósseo foi reconhecida. Muitos estudos passaram, então, a mostrar que há diminuição da massa óssea com o aumento da idade (GUAGUEN & BARD, 1982).

Mais tarde alguns autores afirmaram que o aumento da idade, deficiência de estrógeno, baixa entrada de cálcio no organismo, tabagismo e diminuição da atividade física, também, seriam fatores contribuintes para o desenvolvimento da osteoporose e conseqüentemente causar fraturas (RIGGS & MELTON, 1986; CUMMINGS et al., 1995; JOHNELL et al., 1995).

A osteoporose é freqüentemente doença silenciosa, até a ocorrência de fratura. Quando comparado ao osso normal, o osso osteoporótico mostra redução do número e espessura das trabéculas além de perda da conectividade entre trabéculas, que resultam em diminuição da resistência óssea. A ocorrência de fraturas pode, também, causar deformidade nas vértebras, conseqüência da perda da resistência acompanhada de achatamento vertebral, levando à diminuição da estatura (HAWKER, 1996).

A relação entre esforço aplicado e arquitetura óssea foi primeiramente reconhecida por Galileu, que verificou a associação entre peso e tamanho da estrutura óssea. Wolff descreveu a maneira como as mudanças na arquitetura óssea e a conformação externa do osso acompanhavam as mudanças na sustentação de peso pelo processo de remodelação esquelética. Por este mecanismo, exercícios com peso aumentariam a densidade e resistência óssea (KAPLAN, 1987).

De acordo com a Lei de Wolff a geometria do osso cortical e padrões da estrutura trabecular são resultantes da adaptação funcional fisiológica frente à solicitação mecânica induzida pelos exercícios físicos. Carga mecânica promove deformação no osso e conseqüentemente gera estímulo para resposta óssea local. Quando ocorre diminuição da carga mecânica, pode surgir doença óssea metabólica por desuso e fraturas. O osso é um material viscoelástico cujas propriedades mecânicas são afetadas pelo grau de deformação (JIANG et al., 1999).

Baseado em critérios da Organização Mundial de Saúde é possível estimar que 15% das mulheres caucasianas pós-menopausa nos Estados Unidos e 35% das mulheres, com idade superior a 65 anos, apresentem algum grau de osteoporose e 50% apresentem diminuição da densidade mineral na região proximal do fêmur. Uma em cada duas mulheres caucasianas provavelmente, terá algum tipo de fratura causada pela osteoporose ao longo da vida. Existe, também, risco de homens e mulheres não caucasianas virem a ter algum tipo de fratura causada pela osteoporose (LANE et al., 2000).

Estudo populacional realizado nos Estados Unidos analisou a massa óssea de 14.646 indivíduos de ambos os sexos por meio da densitometria óssea do fêmur. Os resultados comprovaram perda óssea compatível com diagnóstico de osteoporose em 13% a 18% da população feminina acima dos 50 anos e em 3% a 6% da população masculina. A projeção destes dados sugere que no período de 1995 a 2020, 534 mil fraturas da região do quadril ocorrerão nesta população, a um custo operacional de 24 bilhões de dólares (MARQUES NETO, 2001).

Nos E.U.A. o número de fraturas relacionadas à osteoporose aproxima-se de um milhão/ano. A mortalidade chega a 20% nos doze meses subseqüentes à fratura da porção proximal do fêmur e, dos que sobrevivem, 50 % não voltam a andar independentemente (KRANE & HOLICK, 1994).

De acordo com os dados da Academia Americana de Pesquisas Ortopédicas em 1999 houve mais de 320.000 hospitalizações por fraturas da região do quadril, nos Estados Unidos, apresentando custo de cerca de 12.6 bilhões de dólares em um ano. Em função do aumento de expectativa de vida nos Estados Unidos, estima-se que o número destas fraturas cresça para aproximadamente 650.000/ano até 2050, sendo que 90% das internações serão de pessoas acima de 65 anos (AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPAEDIC SURGEONS, 2001).

Uma em cada três mulheres de idade avançada e um em cada seis homens idosos sofrerão fratura da extremidade proximal do fêmur, que é a mais grave manifestação da osteoporose, desses, 20% morrerão até um ano após a fratura e outros 30% necessitarão de cuidado domiciliar prolongado. Há, portanto, aumento de mortalidade e da morbidade (KIEL et al., 1987; KANIS & MCCLOSKEY, 1996).

As fraturas associadas com osteoporose são as maiores fontes de morbidade e gastos elevados relacionados ao idoso. A fratura próximal do fêmur é a mais séria conseqüência da osteoporose. Ocorrem em todo o mundo, nos países Ocidentais, Europa e Estados Unidos. É esperado que haja aumento no número de fraturas de quadril em outros países, em razão de mudanças demográficas e pelo fato das mulheres apresentarem expectativa de vida mais longa do que os homens. A incidência deste tipo de fratura aumenta com a idade, na razão de 1% ao ano, nas mulheres com 80 anos nos países ocidentais. Fraturas da região do punho ocorrem com mais freqüência nas mulheres entre 60 e 70 anos e não mostram o mesmo aumento, com a idade, como as fraturas proximais do fêmur. As fraturas vertebrais têm aumento moderado com a idade e ocorrem com mais freqüências nas mulheres do que nos homens (LAET & HA, 2000).

No Brasil nas populações acima de 45 anos, 30% a 47% das mulheres e 13 a 23% dos homens apresentam osteoporose. Estes índices, a partir do ano 2000, deverão estar em cerca de 35 a 52% para as mulheres e 19 a 29% para os homens, considerando-se o envelhecimento populacional (MARQUES NETO & LEDERMAN, 1995).

A prevalência de osteoporose e a incidência de fraturas podem variar de acordo com o sexo e características genéticas. As mulheres brancas na pós-menopausa apresentam maior incidência de fraturas. A partir dos 50 anos, 30% das mulheres e 13% dos homens poderão sofrer algum tipo de fratura. Estudos realizados no Brasil evidenciam incidência similar, especialmente, na população branca (MARQUES NETO, 2001).

A Campanha Nacional de Prevenção da Osteoporose procurou buscar dados que permitissem delinear com maior exatidão o perfil da osteoporose no Brasil; desenvolveu-se, em 1997 e 1998, estudo nos estados do Distrito federal, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com 12.842 mulheres com idade em torno dos 55 anos, sendo 37% das participantes obesas e 17% com sobrepeso e moradoras da zona urbana. Nessa pesquisa, as mulheres tiveram a massa óssea determinada no calcâneo por meio de equipamento ultra-sonométrico. Este método quantifica a densidade do tecido ósseo e permite verificar, indiretamente, o grau de resistência óssea. Os resultados obtidos e analisados estatisticamente foram bastante semelhantes, para os valores de ultra-sonometria nos estados do nordeste e do sul, concluindo-se que o perfil da osteoporose, no Brasil, é semelhante nestes estados que possuem, entretanto, diferentes populações em termos genéticos e ambientais. Até o momento, estes achados representam o primeiro estudo de grandes dimensões e expressiva significância realizado no Brasil, e o único na América do Sul, relacionado à epidemiologia clínica da osteoporose. Os resultados obtidos revelam aspectos intrigantes quanto à possível distribuição da osteoporose no país, tanto em regiões onde efetivamente ocorreu a imigração européia, quanto outras onde predominou a miscigenação entre o negro, o índio e o português (MARQUES NETO, 2001).

No Brasil, o Núcleo de Informações do Ministério da Saúde apresentou os custos relacionados às internações por fraturas de fêmur em pacientes acima dos 60 anos em 1988. Assim, tornou-se possível estimar o custo operacional das fraturas por osteoporose em 1988: em São Paulo e no Rio de Janeiro, ocorreram 9.709 fraturas, a um custo operacional de R\$ 10.920.464,73. Região Norte, ocorreram 514 fraturas, a um custo operacional de R\$ 1.042.684,03; na Região Nordeste, ocorreram 1.756 fraturas, a um custo operacional de R\$ 1.543.384,32; na Região Centro-Oeste, 3.824 fraturas, a um custo operacional de R\$ 4.496.308,85; na Região Sul, 3.184 fraturas, a um custo operacional de R\$ 9.392.820,62. No Brasil deve-se considerar, portanto, que a osteoporose seja enfermidade freqüente e, na maioria das vezes, incapacitante, além de estar relacionada a alto risco de mortalidade. O custo social e familiar das fraturas por osteoporose é grande. É significativo o número de pessoas afetadas, sendo caro e longo o tratamento a que foram submetidas (MARQUES NETO, 2001).

RIGGS & MELTON (1986) definiram duas formas de osteoporose: primária e secundária. A osteoporose primária, Tipo I, decorre de atividade osteoclástica acelerada e corresponde à osteoporose pós-menopausa, relacionada à deficiência de estrógeno. O Tipo II, também considerada forma primária de osteoporose, apresenta reabsorção óssea normal ou ligeiramente aumentada, associada a atividade osteoblástica diminuída; corresponde à pós-menopausa tardia ou osteoporose senil. A perda de massa óssea relacionada à menopausa resulta em 15% a 30% de decréscimo de osso trabecular e de 10% a 15% no osso cortical.

Após o estudo de RIGGS & MELTON (1986) a sinonímia osteoporose Tipo I e Tipo II passou a ser substituída pelo conceito único de osteoporose primária. A osteoporose pós-menopausa juntamente com a senil são formas primárias de osteoporose. A causa de perda de massa óssea no homem idoso, não está totalmente esclarecida, mas há evidências de que a deficiência hormonal no homem tenha papel importante no metabolismo ósseo. A osteoporose secundária está relacionada à grande variedade de condições mórbidas que podem resultar em distúrbios da absorção intestinal de cálcio ou em hipostrogenismo precoce. Distúrbios da absorção intestinal de cálcio, doença



celíaca, síndromes de má absorção intestinal, enterocolopatias inflamatórias crônicas, pancreatite, etilismo crônico, e por hipoestrogenismo precoce como hipogonadismo, disgenesia gonadal, síndrome de Turner e outras endocrinopatias, como diabete, doenças da tireóide e da supra renal.

Osteoporose está associada a numerosos fatores de risco, alguns podem ser modificados e outros não. Os fatores de risco que não podem ser modificados são: antecedentes de fraturas, origem caucasiana, idade avançada, sexo feminino e fatores de risco que podem ser modificados: tabagismo, baixo peso corpóreo, deficiência de estrógeno, baixa ingestão de cálcio, alcoolismo, quedas constantes e atividade física inadequada. A perda óssea atribuída à menopausa pode ser de 10% a 15% nos corpos vertebrais. O fumo e consumo exagerado de álcool podem aumentar, em duas vezes, o risco de osteoporose (LANE et al., 2000).

O processo de remodelação óssea começa durante o período fetal, acelera-se durante a infância e continua por toda a vida. Na criança de 2 anos, a taxa de remodelação do osso cortical é de 50% ao ano. No adulto, a remodelação cortical diminuiu para aproximadamente 5% ao ano. No final da adolescência, quando o crescimento longitudinal diminuiu, a densidade óssea aumenta rapidamente e atinge o pico após a maturação esquelética, ao redor dos 35 anos para o osso cortical e mais cedo para o osso trabecular. A perda óssea relacionada à idade inicia-se, tanto em homens como em mulheres, ao redor dos 40 anos. As mulheres perdem 35% a 40% do osso cortical e 55% a 60% do osso trabecular enquanto os homens perdem cerca de dois terços dessas quantidades durante toda a vida. Além da perda óssea, relacionada à idade, as mulheres também perdem osso cortical em proporção de 2% a 3% ao ano após a menopausa. Ao redor de 75 anos a massa esquelética pode ser a metade daquela existente aos 30 anos (KAPLAN, 1987). O risco de fraturas aumenta rapidamente em mulheres por volta dos 65 anos de idade (TURNER, 1999).

O conceito de limiar de fratura está intimamente ligado à condição estrutural de sustentação do esqueleto que por sua vez se correlaciona à massa óssea presente. Estudo radiológico, em pacientes assintomáticas, revelou que a osteoporose só se torna evidente quando já ocorreu redução de 30% a 50% de

massa óssea. Clinicamente, a massa óssea pode ser avaliada por meio de radiografias e mais especificamente pela densitometria óssea de emissão dupla considerado padrão ouro (FERNANDES, 1998).

As diferenças de densidade óssea na maturidade esquelética podem ser creditadas em parte, às diferenças genéticas e sexuais. As mulheres brancas têm os esqueletos mais leves, os homens negros esqueletos mais pesados, homens brancos e mulheres negras têm esqueletos de densidade intermediária. Essa ordem de classificação corresponde à ordem da classificação da ocorrência de fraturas. Mulheres de baixa estatura e de origem européia tendem a ter um esqueleto mais frágil e conseqüente incidência elevada por ter osteoporose com a idade avançada e maior risco de desenvolver fraturas (RIGGS & MELTON, 1986).

A formação do osso é estimulada por influências hormonais e por atividades de carga. Entre as teorias para explicar a função do estrogênio na supressão da perda óssea encontra-se a relação entre o nível hormonal e o papel da calcitonina. O estrógeno tem influência essencial no osso e inibe diretamente a secreção da citocina interleucina IL-1 de monócitos periféricos e outras citocinas de osteoblastos pela ação do receptor estrogênico. As citocinas são peptídeos endógenos com efeito poderoso na remodelação óssea. Essa é uma teoria segundo a qual os estrogênios atuam de maneira indireta sobre o osso, ao estimular a secreção de calcitonina pelas células medulares da tireóide. A falta de estrogênio leva à produção aumentada dessas citocinas, promovendo a formação de osteoclastos de reabsorção óssea e acarretando aumento final na reabsorção óssea em relação à formação óssea (KAPLAN, 1987).

Osteoporose é uma das doenças mais importantes, relacionadas à idade, podendo levar o idoso à dependência física, aumento da morbidade e custo elevado com o tratamento da doença. Em razão da magnitude do problema é importante a prevenção, por meio de programas efetivos na redução da incidência do maior problema de saúde pública (RIGGS & MELTON, 1986).

A menopausa (do grego *mens* = mês, *pausis* = pausa) é definida como a interrupção permanente da menstruação, em conseqüência da perda definitiva da atividade folicular ovariana. Ocorre, na maioria das mulheres de países

industrializados em torno dos 50 anos de idade, variando entre 48 e 52 anos (OLDENHAVE et al., 1993; FERREIRA, 1999).

O climatério, termo derivado do grego (*klimacton* = crise), que significa período de crise ou mudança pode ser definido como a fase de transição entre a fase reprodutiva ou menacme e a fase não reprodutiva ou senilidade. A menopausa sinaliza o fim da função ovulatória, ou seja, reprodutiva, com diminuição da produção estrogênica (ALEIXO, 1999).

Uma das conseqüências significantes da menopausa, reconhecidas em todo mundo, não é o temporário desconforto ocasionado pelas ondas de calor, mas sim o fato de que uma em cada quatro mulheres, na faixa etária dos 65 anos ou mais (cerca de 15 anos após a ocorrência da menopausa), torna-se física e psicologicamente inválida em decorrência dos transtornos ocasionados pela osteoporose. A perda óssea tende a ser mais acentuada nos primeiros anos que se seguem à menopausa ou a ooforectomia bilateral. A perda da função ovariana representa por si só risco para o desenvolvimento da osteoporose. Durante o período do climatério deve existir a preocupação na conservação da massa óssea (FERNANDES, 1998).

GREENBLAT et al. (1976) consideraram a menopausa como período fisiológico, porém acompanhada de deficiência estrogênica. O declínio da função ovariana é associado à perda da atividade reprodutiva, devido à exaustão do parênquima folicular e perda da sensibilidade dos folículos às gonadotrofinas. Quanto mais rápida a falência ovariana maior a possibilidade de instalação da síndrome menopaúsica severa que é bem caracterizada após castração cirúrgica.

Os resultados do tratamento da osteoporose costumam ser precários. Por esta razão, nos últimos anos, maior ênfase tem sido dada às medidas profiláticas, procurando-se evitar que se instale a osteoporose em indivíduos tornando menos freqüente a ocorrência de fraturas (FERNANDES, 1998).

A prevenção da osteoporose é um projeto ao longo da vida que começa com a adoção de hábitos e condutas saudáveis na infância. É importante a alimentação balanceada durante a infância e adolescência, principalmente a ingestão de cálcio que exerce efeito protetor na massa óssea. Atividade física na adolescência e na idade adulta, também pode contribuir para o aumento da

densidade mineral óssea e estímulo ao ciclo de remodelação óssea (NOTELOVITZ, 2001).

Mulheres na menopausa podem ter vida saudável, seguindo algumas orientações básicas: atividade física moderada, não fumar, não ingerir bebidas alcoólicas excessivamente, suplementação de cálcio, exposição ao sol diariamente, vida sexual ativa, relaxamento e diminuição do estresse. Seguindo todas estas recomendações a mulher poderá melhorar o estilo de vida e ter boa qualidade de vida na menopausa (CUTSON & MEULEMAN, 2000).

A osteoporose é problema de Saúde Pública e pode se agravar durante as próximas décadas. Estratégias preventivas que investiguem maneiras de aumentar a resistência óssea, e diminuir a incidência de fraturas têm se tornado objetivo de pesquisa (BENNELL et al., 2000).

Nos últimos anos, tem aumentado o número de pesquisas direcionadas a verificação das alterações das propriedades mecânicas do tecido ósseo que ocorre em mulheres no período pós-menopausa. Ainda existem dúvidas a respeito das alterações nas propriedades mecânicas que ocorrem no osso trabecular com osteoporose causadas pela diminuição do estrógeno. Uma das principais dificuldades reside no conhecimento do tempo mínimo, ou a partir de quanto tempo de instalação da osteoporose é necessário, para o comprometimento da resistência mecânica do osso após a diminuição do nível de estrógeno (GUO & GOLDSTEIN, 2000).

Em estudo recente, RIGGS & MELTON (2002), afirmaram que o estrógeno é o hormônio mais importante na manutenção da massa óssea e a deficiência deste hormônio pode ser considerada a maior causa de perda óssea relacionada com a idade em ambos os sexos. Embora estrógeno e testosterona sejam importantes reguladores do crescimento e maturação do esqueleto e para o desenvolvimento da massa óssea, o estrógeno é considerado o melhor indicador da previsão de perda óssea.

Em razão das dificuldades e limitações existentes em pesquisas clínicas sobre osteoporose como, por exemplo, investigar as possíveis associações existentes entre as perdas identificadas por meio da densitometria e as alterações nas propriedades mecânicas, é que surgem os trabalhos

experimentais que podem, em condições controladas, avaliar, principalmente, as características mecânicas dos ossos, quantificação essa impossível em seres humanos.

Em ratos e humanos, o aumento do estrógeno durante a adolescência leva ao aumento da massa óssea e satisfaz a necessidade mecânica (TURNER,1999). Na ausência de ciclos, as ratas continuam a produzir esteróides, por meio de cistos contidos nos ovários. A remoção dos ovários é, portanto, necessária para o total estabelecimento da deficiência estrogênica (MARQUES & TAVEIRA,1998).

DIAS et al. (1982) afirmaram que na menopausa os ovários continuam à produzir estrógeno em menor quantidade, mesmo com a ocorrência da falência do parênquima folicular e concluíram que, após a menopausa, a principal fonte de produção hormonal são as supra renais, e tecido adiposo periférico.

O rato é, também, animal adequado para estudo do envelhecimento por apresentar, assim como humanos, perda de massa óssea com a idade, relacionada à menopausa (DAVICCO et al.,1998).

Ratas Wistar são consideradas adultas com 90 dias de idade e ambos os sexos se tornam sexualmente maduros em torno de 50 a 60 dias de idade (FARRIS, 1960). Outros autores afirmaram que a maturação sexual ocorre com 130 dias de idade (BOYKO & ZEBROWISK et al.,1972), e são, portanto, animais adequados para experimentação em estudos sobre osteoporose e envelhecimento.

Em animais, como em humanos, a capacidade de formação do osso torna-se prejudicada com a idade. Vários estudos *in vitro* também demonstraram que a atividade osteoblástica diminuiu com a idade em animais (TABUCHI et al., 1986; TSUJI et al., 1990; LIANG et al., 1992; INOUE et al., 1997).

VOGEL (1980) realizou estudos experimentais de parâmetros mecânicos em ratas, analisando as alterações relacionadas a maturação e senelidade. Estudou a influência da maturação e idade em vários órgãos, em animais com quatro e oito semanas, quatro, 12 e 24 meses. Foram consideradas jovens até quatro meses e adultas entre quatro e 12 meses e senis com 24

meses. Os resultados indicaram aumento da resistência durante a maturação e diminuição durante o envelhecimento.

THOMPSON et al. (1995) desenvolveram estudo com o objetivo de investigar a adequação de diversos modelos, tendo o rato como animal de experimentação, em osteoporose. Concluíram que o melhor modelo animal para estudos da osteoporose no período pós-menopausa é a ooforectomia em ratas, por induzir o aumento do "turnover" ósseo que resulta em perda óssea. Estes autores descreveram as alterações que ocorrem na porção proximal da tíbia, região distal do fêmur e vértebras lombares, após ooforectomia, como semelhantes às alterações observadas em mulheres no período pós menopausa. Desde então este modelo tem sido utilizado em estudos sobre a prevenção de osteoporose.

Ratas adultas e ovariectomizadas perdem osso cortical e osso esponjoso de maneira similar, se não idêntica às mulheres no período pós-menopausa. Perde-se massa óssea nos locais onde ocorre menor solicitação mecânica. Parece haver estreita relação entre os efeitos do estrógeno e o estímulo mecânico na manutenção da integridade óssea (TURNER, 1999).

Também, em investigações endocrinológicas, utiliza-se o rato como animal de experimentação, mas as características dos delineamentos adotados, quanto à idade, peso, sexo e tempo de atuação da privação hormonal, são bastante variáveis na literatura.

Além da diversidade de delineamento a maioria dos trabalhos analisados procurou avaliar as conseqüências da privação hormonal a curto e médio prazo. Deve-se considerar, entretanto, a necessidade da realização de estudos que tenham como objetivo estudar de forma associada os efeitos da privação hormonal e do envelhecimento natural, situação freqüente na prática clínica, e para este propósito seria mais adequada a adoção de períodos mais longos de observação abrangendo a maior parte do ciclo de vida do animal de experimentação escolhido.

Pela análise da literatura disponível pode-se considerar, também, que a osteoporose, principalmente na forma que ocorre após a menopausa, deve permanecer como importante problema de saúde pública nos próximos anos e os

conhecimentos derivados de investigações experimentais certamente poderão contribuir de maneira significativa, principalmente, no estudo de estratégias que permitam manter a resistência óssea, nas mulheres após a menopausa, com conseqüente diminuição da incidência de fraturas e complicações associadas.

## OBJETIVO

O objetivo da presente investigação é analisar por meio de estudo clínico, biomecânico e histológico os efeitos da menopausa induzida por ooforectomia bilateral, no tecido ósseo de ratas, ao longo da maior parte do ciclo de vida.

---

\* Na elaboração deste estudo foram observadas as seguintes condições:

- 1 - Volpato ESN, Silva RC, Pizzani, L. Manual de apresentação de trabalho científico: tese, dissertação, monografia. Botucatu: Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, Unesp, Campus de Botucatu, 2003 [cited 2004 Set 03]. Available from: [www.biblioteca.btu.unesp.br](http://www.biblioteca.btu.unesp.br).
- 2 - Projeto aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp sob Protocolo nº 233/2001.
- 3 - Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental "WILLIAM SAAD HOSSNE", do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).



## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 - Animais de Experimentação

Foram utilizadas 64 ratas adultas e virgens, *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, procedentes do Biotério Central do Campus de Botucatu - UNESP.

### 2.2 - Grupos Experimentais

Para desenvolver esta investigação foram criados dois grupos experimentais, divididos em subgrupos. Os animais pertencentes a cada grupo e subgrupo foram definidos por sorteio.

#### 2.2.1 - Grupo A (Ooforectomia)

Composto por 32 animais, que foram submetidos à ooforectomia e divididos em subgrupos conforme o momento experimental de sacrifício:

**Sub-grupo A1** - Composto por oito animais submetidos à ooforectomia bilateral e sacrificados após três meses de cirurgia;

**Sub-grupo A2** - Composto por oito animais submetidos à ooforectomia bilateral e sacrificados após seis meses de cirurgia;

**Sub-grupo A3** - Composto por oito animais submetidos à ooforectomia bilateral e sacrificados após nove meses de cirurgia;

**Sub-grupo A4** - Composto por oito animais submetidos à ooforectomia bilateral e sacrificados após 12 meses de cirurgia.

### 2.2.2 - Grupo B (Placebo)

Composto por 32 animais, que foram submetidos à cirurgia placebo e divididos em subgrupos conforme o momento experimental de sacrifício:

**Sub-grupo B1** - Composto por oito animais submetidos à cirurgia placebo bilateral e sacrificados após três meses de cirurgia;

**Sub-grupo B2** - Composto por oito animais submetidos à cirurgia placebo bilateral e sacrificados após seis meses de cirurgia;

**Sub-grupo B3** - Composto por oito animais submetidos à cirurgia placebo bilateral e sacrificados após nove meses de cirurgia;

**Sub-grupo B4** – Composto por oito animais submetidos à cirurgia placebo bilateral e sacrificados após doze meses de cirurgia.

### 2.3 - Fases do Experimento

O experimento foi dividido de acordo como o delineamento em seis fases:

- 1<sup>a</sup> fase: adaptação;
- 2<sup>a</sup> fase: ooforectomia ou cirurgia placebo - momento 0;
- 3<sup>a</sup> fase: sacrifício após três meses - momento 1;
- 4<sup>a</sup> fase: sacrifício após seis meses - momento 2;
- 5<sup>a</sup> fase: sacrifício após nove meses - momento 3 ;
- 6<sup>a</sup> fase: sacrifício após 12 meses - momento 4.

### **2.3.1 - Recepção e adaptação (1ª fase)**

Recebimento dos animais do Biotério Central, exame clínico, identificação, pesagem e sorteio para determinação do grupo experimental. Os animais permaneceram alojados durante três meses, até atingirem a fase de maturação, com quatro meses de idade.

### **2.3.2 - Momento 0**

Quando os animais atingiram a idade adulta (quatro meses de idade) foi realizado o procedimento cirúrgico, ooforectomia bilateral ou cirurgia placebo conforme o grupo.

### **2.3.3 - Momento 1**

Sacrifício após período de três meses de pós-operatório (sete meses de idade).

### **2.3.4 - Momento 2**

Sacrifício após período de seis meses de pós-operatório (dez meses de idade).

### **2.3.5 - Momento 3**

Sacrifício após período de nove meses de pós-operatório (13 meses de idade).

### **2.3.6 - Momento 4**

Sacrifício após período de 12 meses de pós-operatório (16 meses de idade).

Quadro 1 - Representação esquemática do delineamento (grupo ooforectomia)

<b>Grupo</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
<b>n</b>	8 animais	8 animais	8 animais	8 animais
<b>Tratamento</b>	Ooforectomia	Ooforectomia	Ooforectomia	Ooforectomia
<b>Tempo pós-operatório</b>	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
<b>Idade</b>	7 meses	10 meses	13 meses	16 meses
<b>Momento</b>	M1	M2	M3	M4

Quadro 2 - Representação esquemática do delineamento (grupo placebo)

<b>Grupo</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>
<b>n</b>	8 animais	8 animais	8 animais	8 animais
<b>Tratamento</b>	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo
<b>Tempo pós-operatório</b>	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
<b>Idade</b>	7 meses	10 meses	13 meses	16 meses
<b>Momento</b>	M1	M2	M3	M4

## 2.4 - Atributos Estudados

2.4.1 - Estudo Clínico: peso corpóreo.

2.4.2 - Estudo Biomecânico: propriedades mecânicas (carga máxima e coeficiente de rigidez).

2.4.3 - Estudo Histológico: histomorfometria (área trabecular).

## 2.5 - Seqüência dos Tempos Experimentais

2.5.1 - Seqüência dos tempos experimentais na 1ª fase (recepção e adaptação)

2.5.1.1 - Exame clínico geral.

2.5.1.2 - Identificação.

2.5.1.3 - Pesagem.

2.5.1.4 - Sorteio (Definição dos grupos).

2.5.1.5 - Alojamento.

**2.5.2** - Seqüência dos tempos experimentais na segunda fase (ooforectomia ou cirurgia placebo)

2.5.2.1 - Exame clínico geral.

2.5.2.2 - Identificação.

2.5.2.3 - Pesagem.

2.5.2.4 - Procedimento cirúrgico: ooforectomia ou cirurgia placebo, conforme o grupo.

**2.5.3** - Seqüência dos tempos experimentais na terceira, quarta, quinta e sexta fase (sacrifício e coleta das peças anatômicas para estudo)

2.5.3.1 - Pesagem.

2.5.3.2 - Identificação

2.5.3.3 - Sacrifício.

2.5.3.4 - Obtenção das peças anatômicas para estudo.

## **2.6 - Técnicas utilizadas**

### **2.6.1 - Manutenção**

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com tampa de metal, contendo cinco animais cada, em local seco e arejado, limpas diariamente, com temperatura controlada entre 20 – 24° C e ciclo noite / dia de 12 horas. Receberam ração e água *ad libitum*.

### **2.6.2 - Pesagem**

A pesagem das ratas foi realizada utilizando-se balança comercial com capacidade de seis quilogramas e variação de cinco gramas. Durante todo o experimento, o peso, foi aferido mensalmente e no dia do sacrifício.

### **2.6.3 - Anestesia**

As ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico 3% na dose de 30 mg/kg de peso, por via intraperitoneal.

### **2.6.4 - Procedimento cirúrgico: ooforectomia ou cirurgia placebo**

#### **2.6.4.1 - Ooforectomia**

Após a anestesia e tricotomia, as ratas foram colocadas em mesa cirúrgica em decúbito lateral para palpação e visualização da última costela; foi então realizada incisão longitudinal incluindo pele e tecido subcutâneo, de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região entre a última costela e a articulação coxo-femural. Com auxílio de pinça, foi ultrapassado o plano muscular e exposta a cavidade peritoneal. Por divulsão, o tecido muscular foi dividido, permitindo acesso ao ovário envolto em tecido adiposo. Foi realizada ligadura com fio de algodão 3.0 e procedeu-se então à secção distal à ligadura. Para sutura da

musculatura e da pele, utilizou-se fio de nylon 4.0 e repetiu-se o mesmo procedimento no lado contra-lateral para retirada do outro ovário.

#### **2.6.4.2 – Cirurgia placebo**

Os animais do grupo cirurgia placebo foram submetidos aos mesmos procedimentos acima expostos, no grupo ooforectomia, com exceção do tempo cirúrgico de ligadura e secção dos ovários.

#### **2.6.5 - Sacrifício**

Após o tempo pós-operatório pré-fixado para cada subgrupo, as ratas foram sacrificadas com pentobarbital sódico 3% na dose de 80 mg/kg de peso corpóreo, via intraperitoneal.

#### **2.6.6 - Obtenção da peça anatômica (tíbia direita) para estudo biomecânico**

Após o sacrifício, a tíbia direita de cada animal foi desarticulada na região proximal femuro-tibial (joelho) e na região distal na articulação tíbio-társica (tornozelo). Em seguida removeu-se a tíbia da fíbula (distalmente) e foram retiradas todas as partes moles (músculos, tendões e ligamentos), restando apenas o tecido ósseo. Em seguida, os ossos foram embalados em papel alumínio, identificados e congelados à temperatura de -20°C em refrigerador doméstico.

#### **2.6.7 - Obtenção da peça anatômica (tíbia esquerda) para estudo histológico**

Empregou-se a mesma técnica descrita no item anterior. Utilizou-se a tíbia esquerda de cada animal. Em seguida o material foi fixado em formol tamponado a 10% e identificado.

### **2.6.8 – Estudo biomecânico**

Foi utilizada a Máquina Universal de Ensaio Mecânicos EMIC\*, modelo DL 10.000. A precisão do sistema é de  $(0,018 + F/3700)KN$ , apurada dentro das especificações das normas ABTN, NBR6156 e NBR6674. A aferição é realizada periodicamente pelo fabricante.

A Máquina Universal opera em conjunto com microcomputador sob o sistema operacional *Windows 2000*, sendo utilizado o programa de informática Mtest versão 1.00. Este programa permite a realização de ensaios segundo método pré-definido pelo próprio usuário, que escolhe parâmetros e unidades.

Foi realizado ensaio de flexão em três pontos considerando as seguintes propriedades mecânicas estruturais:

1) Carga máxima (N) definida como a carga suportada pelo corpo de prova até a ruptura;

2) Coeficiente de rigidez (N/mm) definido como a relação entre carga e deformação no trecho reto da curva até o limite de elasticidade, sendo portanto indicativo da rigidez da estrutura.

A distância entre os dois apoios de suporte foi padronizada em dois terços do comprimento do corpo de prova. O cutelo de aplicação de carga foi posicionado em ponto equidistante às extremidades.

---

\*EMIC – Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA (Curitiba-PR)



## 2.6.9 - Estudo Histológico

### 2.6.9.1 - Preparo do Material

A preparação das peças anatômicas para estudo histológico obedeceu a seqüência abaixo:

- Fixação (formalina 30%);
- Descalcificação (EDTA);
- Corte da porção proximal da tíbia dividida, então, em dois blocos longitudinais iguais;
- Processamento dos blocos com equipamento automático para desidratação e diafanização;
- Inclusão em parafina utilizando-se o equipamento para cortes histológicos com 6-8  $\mu\text{m}$  de espessura;
- Secagem em estufa a 60°C por 20 minutos;
- Coloração pela Hematoxilina - Eosina.

### 2.6.9.2 - Histomorfometria

Utilizando-se as preparações histológicas realizadas, foi calculada a área das trabéculas ósseas. As lâminas foram colocadas em microscópio acoplado a programa de análise de imagens e visualizadas em monitor de vídeo (área do monitor = 640 x 480); a área foi calculada em cinco campos, após delimitação manual do contorno das trabéculas. O cálculo da área total foi realizado automaticamente pelo programa.

### **2.6.10 - Análise Estatística**

O estudo das variáveis peso, carga máxima e coeficiente de rigidez foi realizado por meio da técnica da análise de variância para o esquema fatorial 2 x 4 (dois grupos e quatro momentos de sacrifício) no modelo inteiramente casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (NORMAN & STREINER, 1994).

Os resultados foram apresentados em tabelas contendo a média e o desvio padrão dos dados acompanhadas de letras minúsculas e maiúsculas para a indicação da significância biológica das comparações. Para leitura das letras deve-se proceder da seguinte maneira:

1 - Para indicação das significâncias de grupos experimentais utilizou-se letras minúsculas ao lado das medidas descritivas dos grupos. Duas medidas seguidas de, uma mesma letra não diferem no nível de 5% de significância.

2 - Para indicação das significâncias de momentos de sacrifício utilizaram-se letras maiúsculas sob as medidas descritivas dos momentos. Duas medidas seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem no nível de 5% de significância.

O estudo das trabéculas foi realizado por meio da técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo com dois fatores (NORMAN & STREINER, 1994).

## 2.7 – Material e Método – Figuras

### 2.7.1 – Procedimento cirúrgico



Figura 1 – Animal em decúbito lateral após anestesia e tricotomia.



Figura 2 – Aspecto do local e dimensão da incisão de pele.

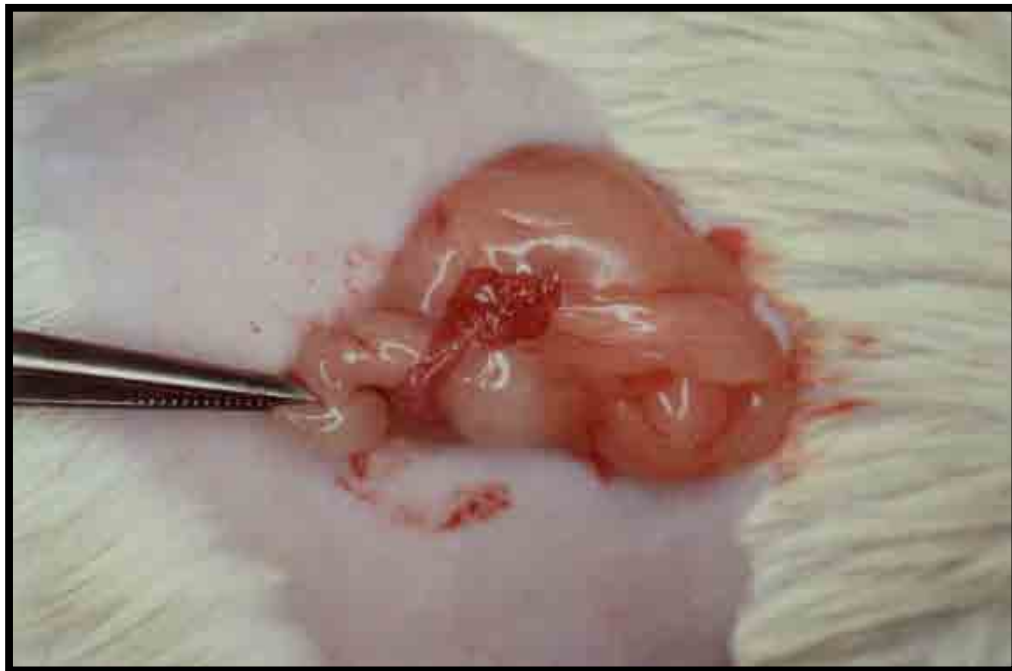


Figura 3 - Aspecto da exposição e identificação do ovário.



Figura 4 – Aspecto do pinçamento do ovário.



Figura 5 – Aspecto da ligadura do ovário com fio de algodão 3-0 antes da secção.



Figura 6 – Aspecto final do procedimento cirúrgico após sutura da pele.

### 2.7.2 – Ensaio mecânico



Figura 7 – Aspecto da máquina universal de ensaios mecânicos com o corpo de prova montado para ensaio de flexão em três pontos.



Figura 8 – Detalhe do corpo de prova montado em dois apoios e do cutelo de aplicação de carga locado em ponto equidistante às extremidades.



### 2.7.3 – Estudo histológico

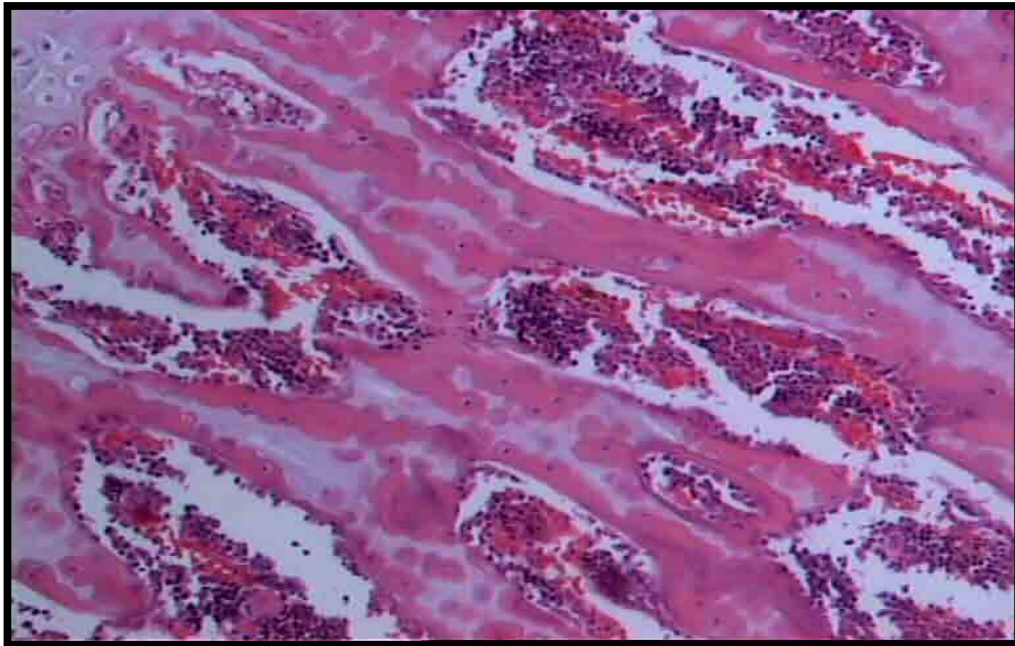


Figura 9 – Aspecto do corte histológico longitudinal da região proximal da tíbia (hematoxilina-eosina, 20X)

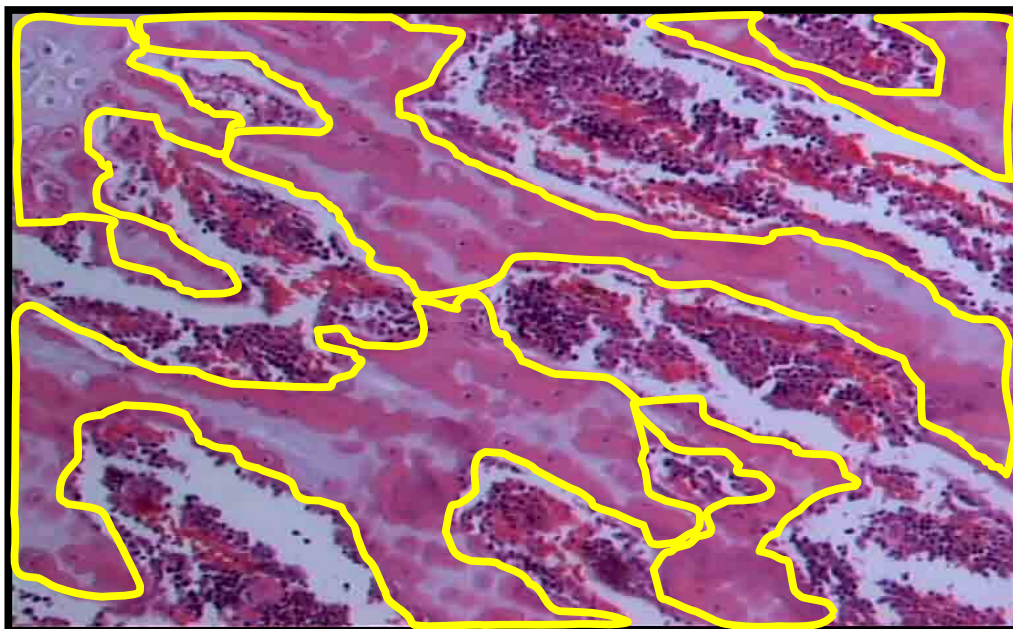


Figura 10 – Aspecto do corte histológico longitudinal da região proximal da tíbia (hematoxilina-eosina, 20X), após delimitação do perímetro das trabéculas para cálculo da área trabecular.

### 3. RESULTADO

#### 3.1 - Estudo Clínico

##### 3.1.1 - Evolução

Não ocorreu óbito de nenhum animal durante todo o experimento. Todos os animais, de ambos os grupos, evoluíram com ausência de infecção no local da cirurgia. Não se observou qualquer alteração de comportamento nos animais submetidos à ooforectomia ou cirurgia placebo.

##### 3.1.2 - Peso corpóreo

A tabela 1 apresenta os valores da média e desvio padrão do peso corpóreo segundo grupo e momento de sacrifício, acompanhados dos resultados da análise estatística. As figuras 11 e 12 ilustram os resultados obtidos.

Tabela 1 – Média e desvio padrão do peso corpóreo (g) segundo grupo e momento de sacrifício e análise estatística.

Grupo	Momento de Sacrifício			
	M <sub>1</sub> (3 meses)	M <sub>2</sub> (6 meses)	M <sub>3</sub> (9 meses)	M <sub>4</sub> (12 meses)
Ooforectomia	333 ± 20 <b>aA</b>	396 ± 27 <b>aAB</b>	412 ± 57 <b>aB</b>	395 ± 58 <b>aAB</b>
Placebo	343 ± 30 <b>aA</b>	367 ± 48 <b>aA</b>	368 ± 48 <b>aA</b>	385 ± 63 <b>aA</b>

DHS (5%) = 53 (para comparação de grupos fixado o momento de sacrifício)

DHS (5%) = 71 (para comparação de momentos de sacrifício dentro do grupo)

Letras minúsculas: comparação vertical

Letras maiúsculas: comparação horizontal

Letras iguais: semelhança; letras diferentes: diferença significativa



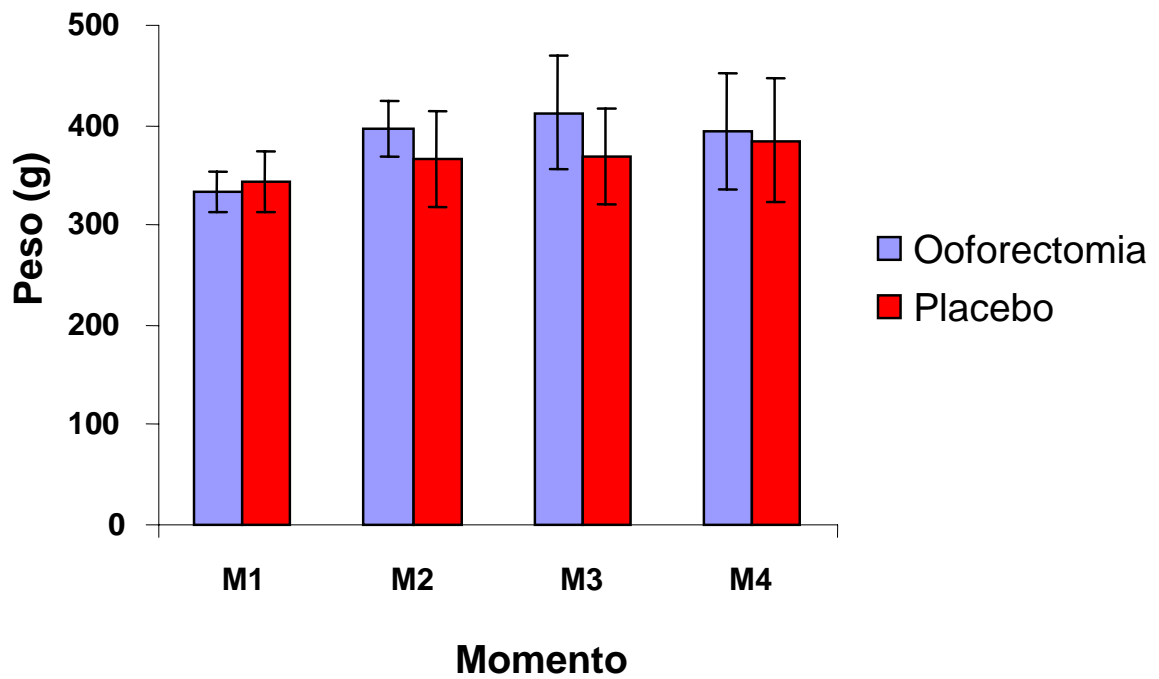


Figura 11 – Média e desvio padrão do peso corpóreo (g) segundo grupo e momento de sacrifício.

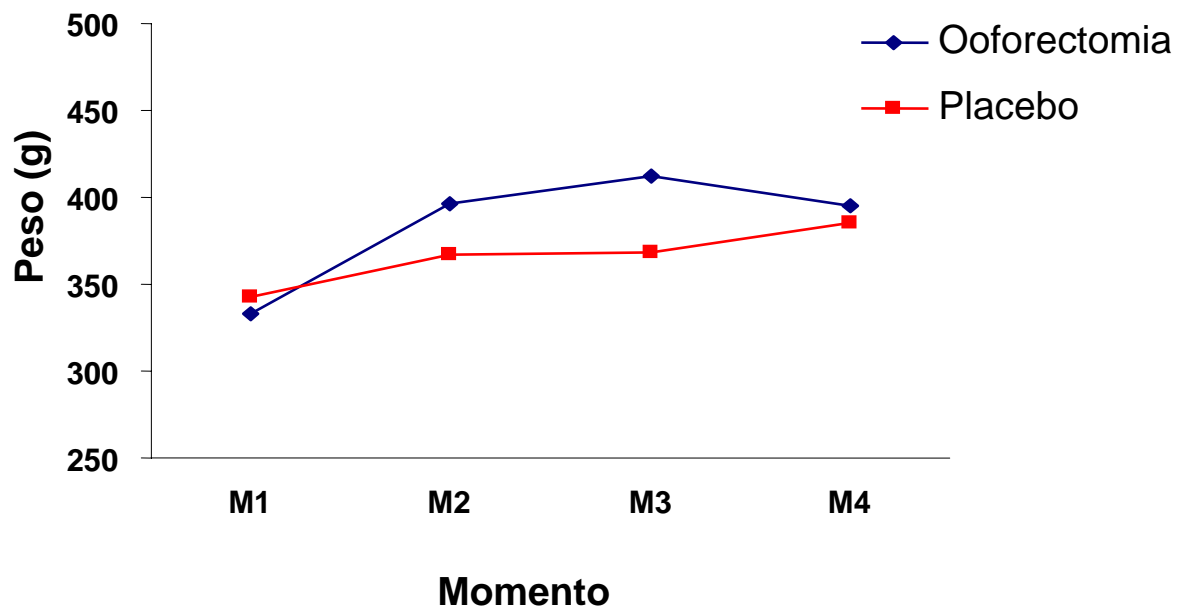


Figura 12 – Média do peso corpóreo (g) segundo grupo e momento de sacrifício.

### 3.2 - Estudo Biomecânico

#### 3.2.1 - Carga máxima

A tabela 2 apresenta os valores da média e desvio padrão da variável carga máxima segundo grupo e momento de sacrifício, acompanhados dos resultados da análise estatística. As figuras 13 e 14 ilustram os resultados obtidos.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da Carga Máxima (N) segundo grupo e momento de sacrifício e análise estatística.

Grupo	Momento de Sacrifício			
	M <sub>1</sub> (3 meses)	M <sub>2</sub> (6 meses)	M <sub>3</sub> (9 meses)	M <sub>4</sub> (12 meses)
Ooforectomia	63,6 ± 5,3 <b>aA</b>	63,3 ± 14,0 <b>aA</b>	66,6 ± 6,6 <b>aA</b>	74,3 ± 5,6 <b>aA</b>
Placebo	67,1 ± 6,7 <b>aA</b>	77,7 ± 17,8 <b>bA</b>	71,2 ± 7,2 <b>aA</b>	76,6 ± 9,1 <b>aA</b>

DHS (5%) = 11,5 (para comparação de grupos fixado o momento de sacrifício)

DHS (5%) = 15,3 (para comparação de momentos de sacrifício dentro do grupo)

Letras minúsculas: comparação vertical

Letras maiúsculas: comparação horizontal

Letras iguais: semelhança; letras diferentes: diferença significativa

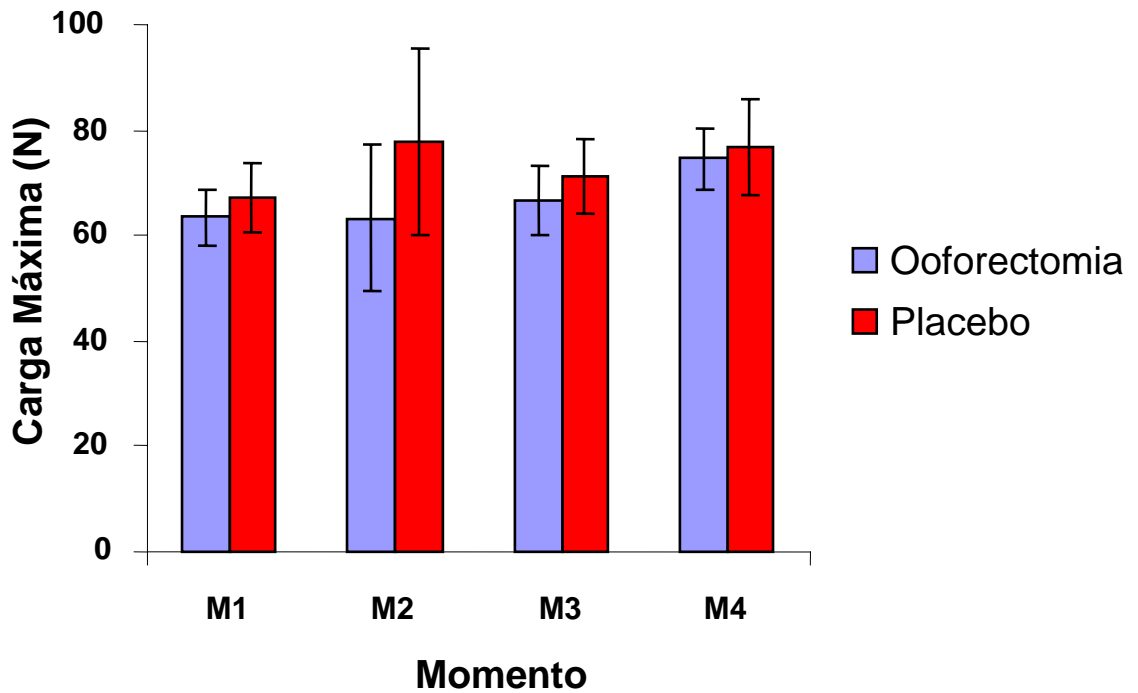


Figura 13 – Média e desvio padrão da Carga Máxima (N) segundo grupo e momento de sacrifício.

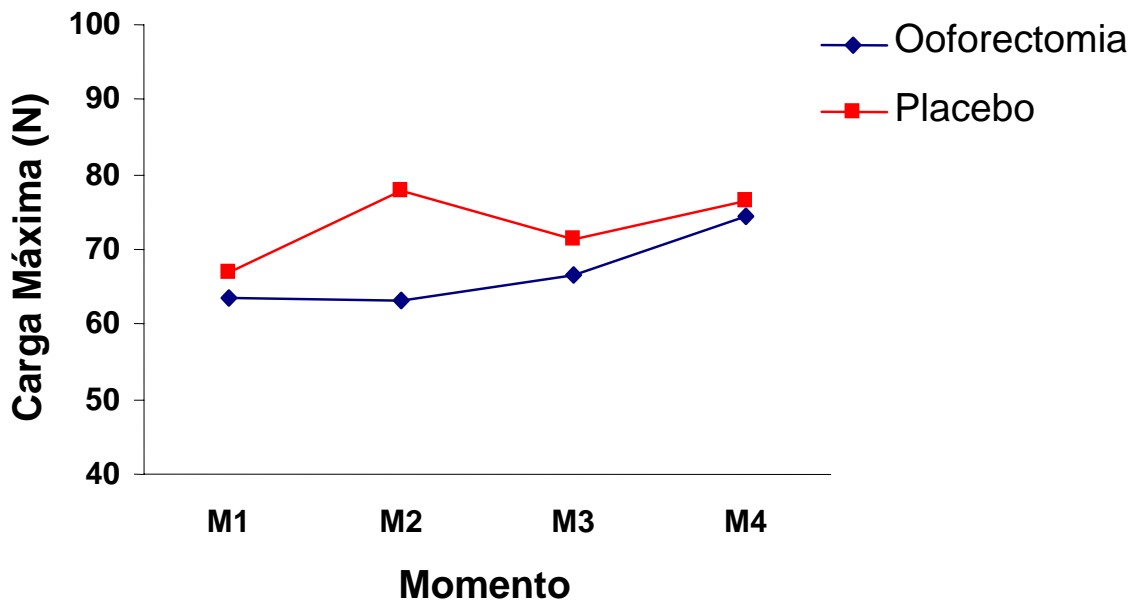


Figura 14 – Média da Carga Máxima (N) segundo grupo e momento de sacrifício.

### 3.2.2 - Coeficiente de Rigidez

A tabela 3 apresenta os valores da média e desvio padrão da variável coeficiente de rigidez segundo grupo e momento de sacrifício, acompanhados dos resultados da análise estatística. As figuras 15 e 16 ilustram os resultados obtidos.

Tabela 3 – Média e desvio padrão do Coeficiente de Rigidez (N/mm) segundo grupo e momento de sacrifício e análise estatística.

Grupo	Momento de Sacrifício			
	M <sub>1</sub> (3 meses)	M <sub>2</sub> (6 meses)	M <sub>3</sub> (9 meses)	M <sub>4</sub> (12 meses)
Ooforectomia	56,5 ± 4,7 <b>aA</b>	52,6 ± 5,3 <b>aA</b>	56,9 ± 4,9 <b>aA</b>	71,8 ± 6,5 <b>aB</b>
Placebo	65,6 ± 6,7 <b>bA</b>	60,7 ± 7,5 <b>bA</b>	62,0 ± 5,3 <b>aA</b>	82,1 ± 7,9 <b>bB</b>

DHS (5%) = 7,2 (para comparação de grupos fixado o momento de sacrifício)  
DHS (5%) = 9,6 (para comparação de momentos de sacrifício dentro do grupo)  
Letras minúsculas: comparação vertical  
Letras maiúsculas: comparação horizontal  
Letras iguais: semelhança; letras diferentes: diferença significativa

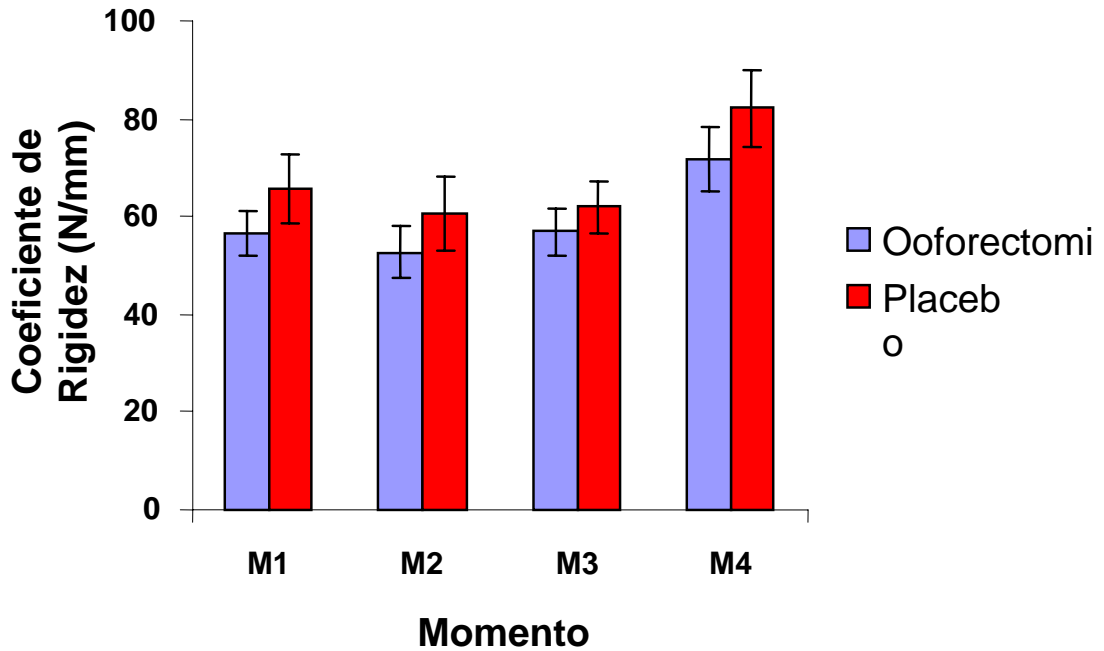


Figura 15 – Média e desvio padrão do Coeficiente de Rigidez (N/mm) segundo grupo e momento de sacrifício.

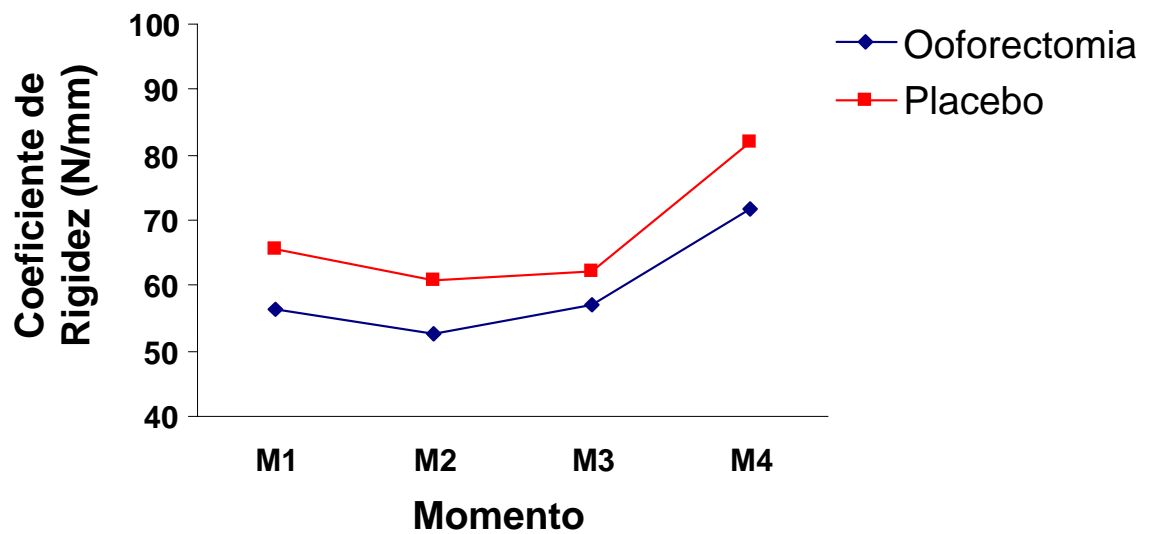


Figura 16 – Média do Coeficiente de Rigidez (N/mm) segundo grupo e momento de sacrifício.

### **3.3 - Estudo Histológico**

#### **3.3.1 - Histomorfometria**

A tabela 4 apresenta os valores da mediana e semi-amplitude total da média da área trabecular segundo grupo e momento de sacrifício, acompanhados dos resultados da análise estatística. As figuras 17 e 18 ilustram os resultados obtidos.

Tabela 4 – Mediana e semi-amplitude total da área das trabéculas ( $\mu\text{m}^2$ ) segundo grupo e momento de avaliação e análise estatística.

GRUPO	MOMENTO				Resultado do teste estatístico de momento
	M1 3 meses	M2 6 meses	M3 9 meses	M4 12 meses	
PLACEBO	557736 ± 124598 aB	419505 ± 165282 bAB	349475 ± 93218 bAB	286523 ± 244994 bA	p < 0,05
OOFORRECTOMIA	409130 ± 153657 aB	119889 ± 99082 aA	126836 ± 78744 aA	169742 ± 121697 aAB	p < 0,05

Resultado do teste estatístico de grupo

p > 0,05      p < 0,05      p < 0,05      p < 0,01

Letras minúsculas: comparação vertical  
 Letras maiúsculas: comparação horizontal  
 Letras iguais: semelhança; letras diferentes: diferença significativa

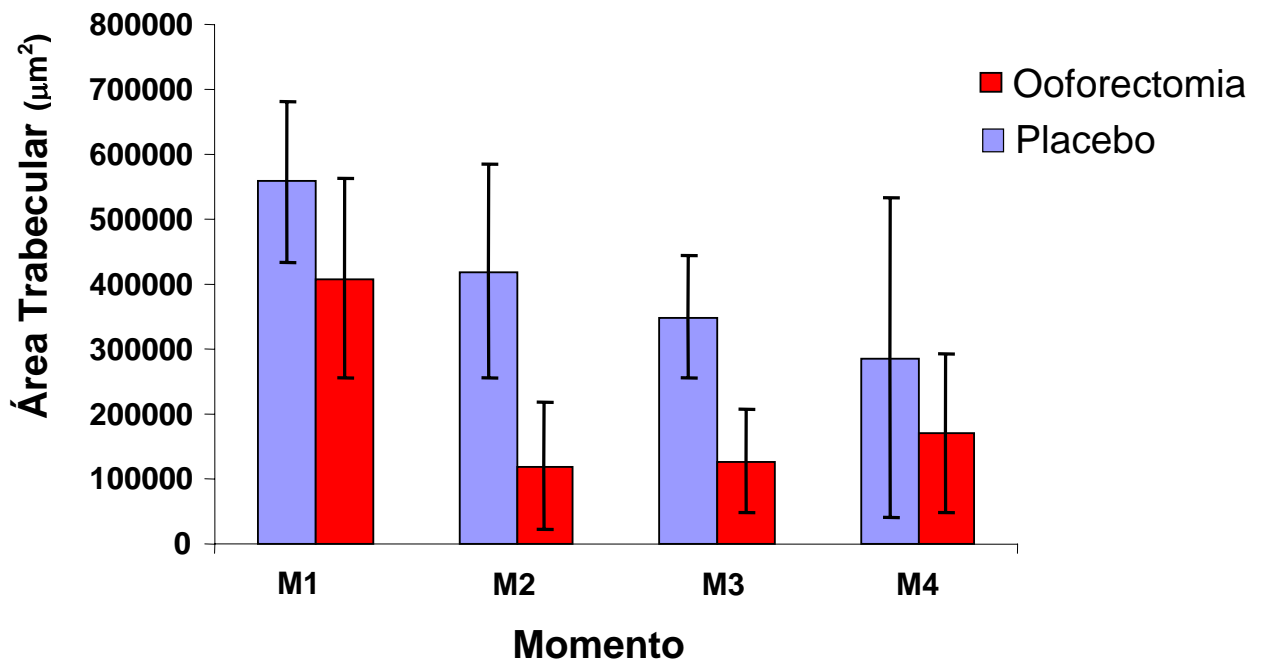


Figura 17 – Mediana e semi-amplitude total da área das trabéculas ósseas segundo grupo e momento de sacrifício.

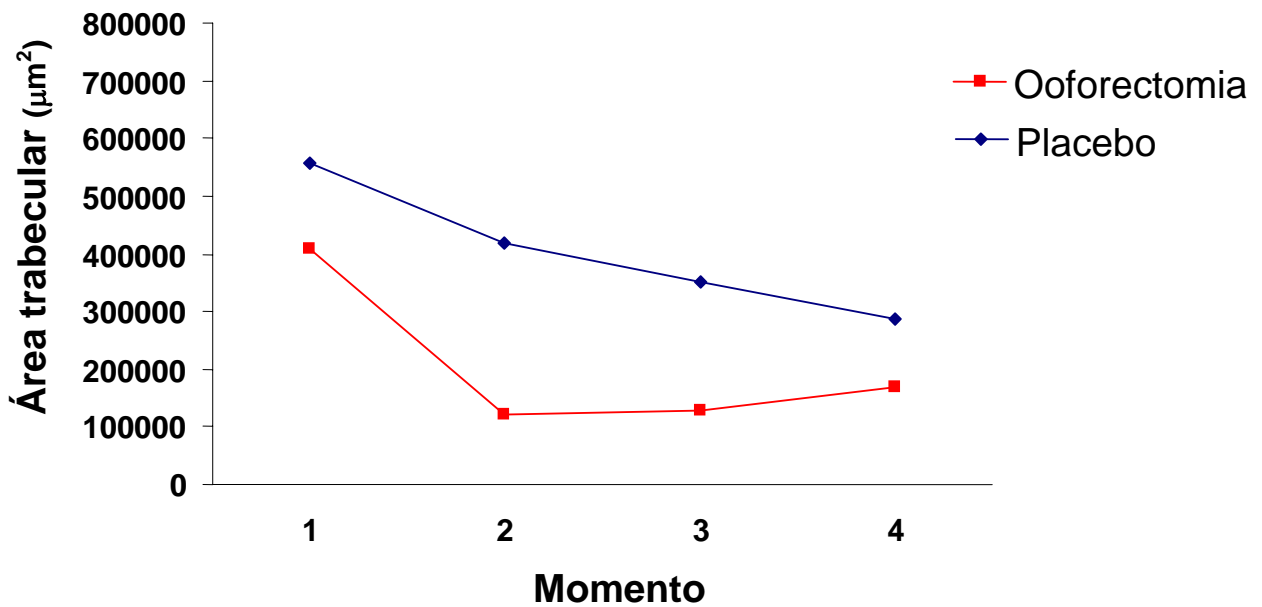


Figura 18 – Mediana da área das trabéculas ósseas segundo grupo e momento de sacrifício.



3.3.2 – Resultado – figuras

3.3.2.1. Estudo biomecânico (diagrama carga - deformação)

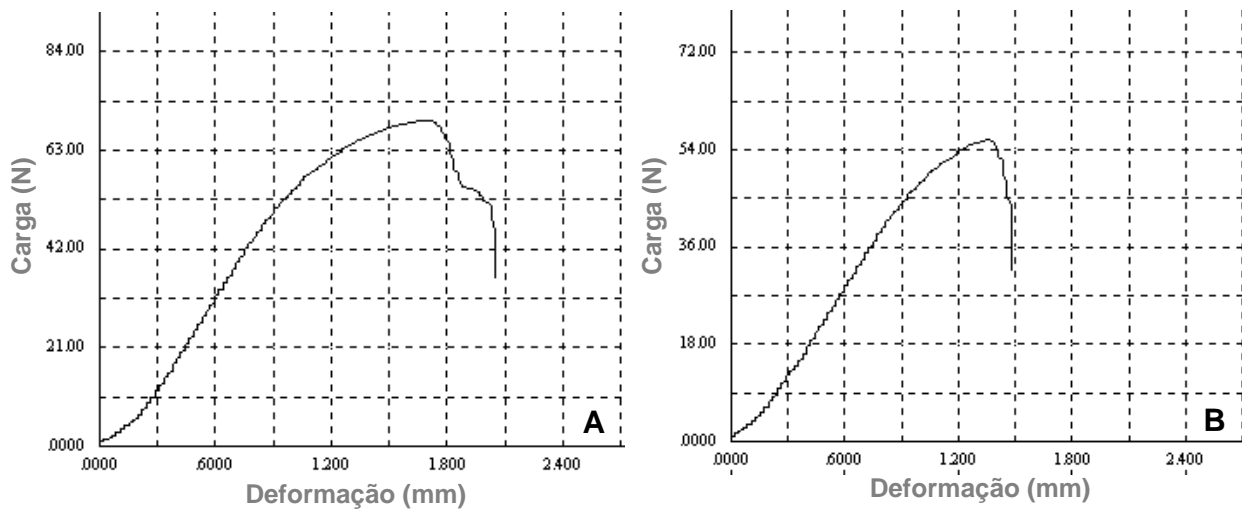


Figura 19 – Diagrama carga-deformação obtido durante ensaio de flexão em animal do grupo ooforectomia (A) e grupo placebo (B), 3 meses.

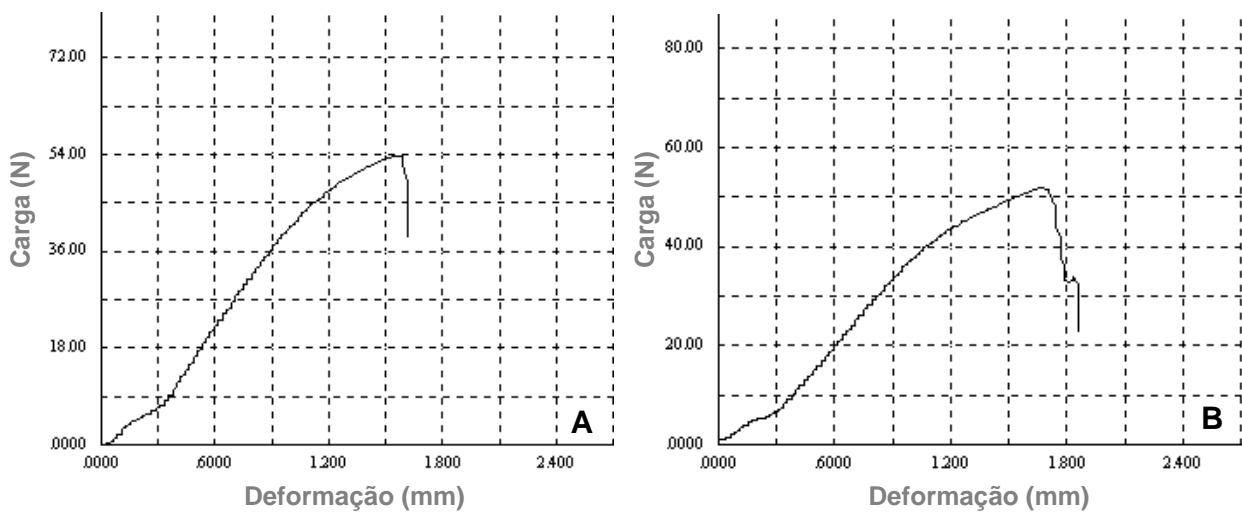


Figura 20 – Diagrama carga-deformação obtido durante ensaio de flexão em animal do grupo ooforectomia (A) e grupo placebo (B), 6 meses.

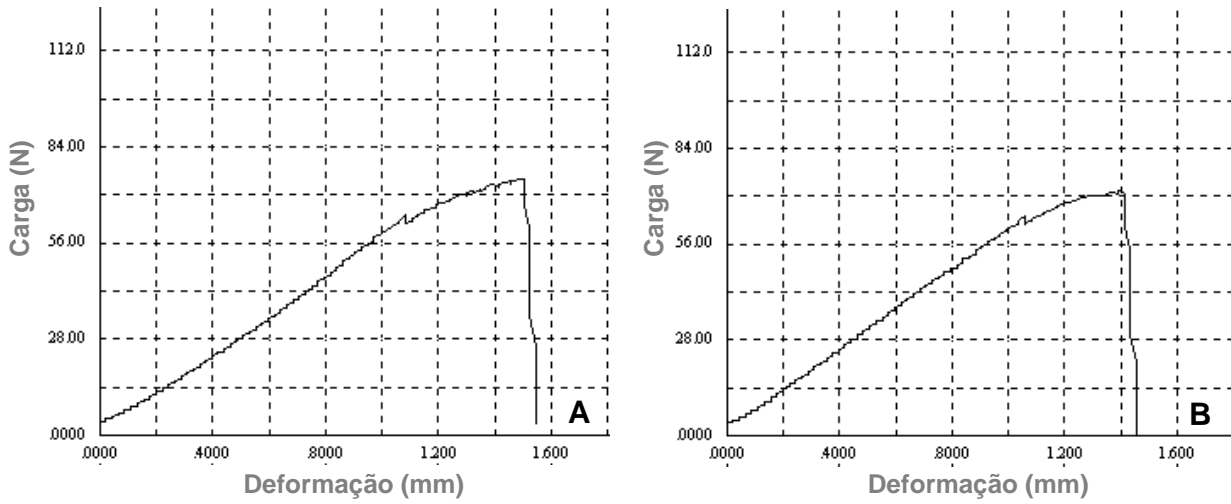


Figura 21 – Diagrama carga-deformação obtido durante ensaio de flexão em animal do grupo ooforectomia (A) e grupo placebo (B), 9 meses.

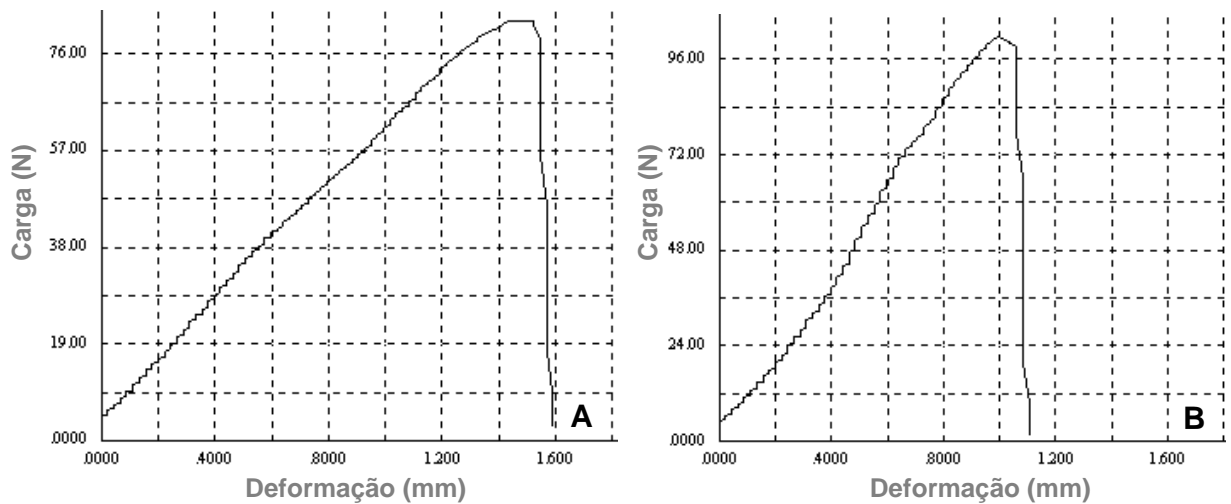


Figura 22 – Diagrama carga-deformação obtido durante ensaio de flexão em animal do grupo ooforectomia (A) e grupo placebo (B), 12 meses.

3.3.2.2 – Estudo histológico

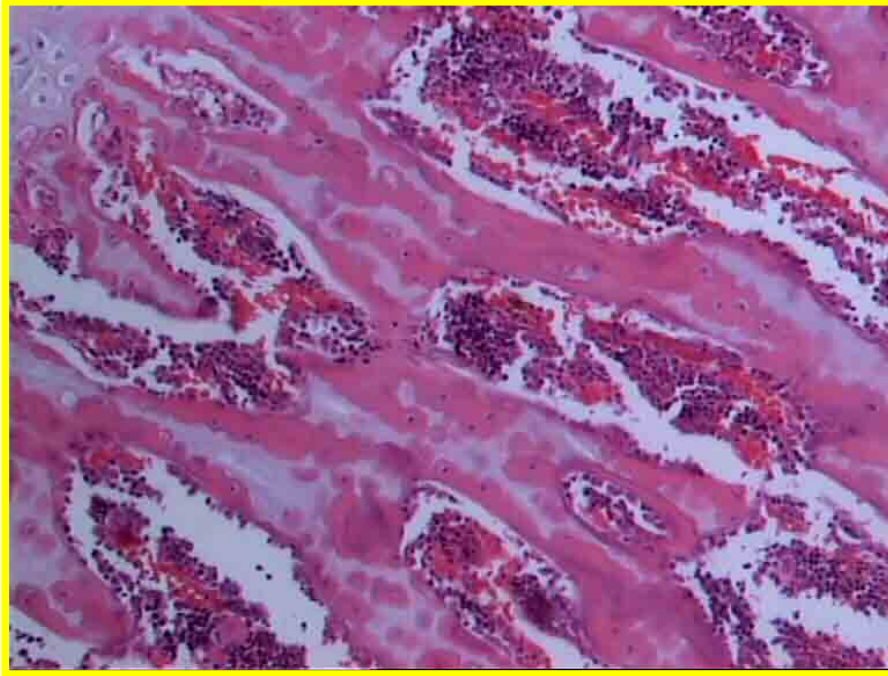


Figura 23 – Corte histológico de animal do grupo placebo, três meses (HE, 20X).

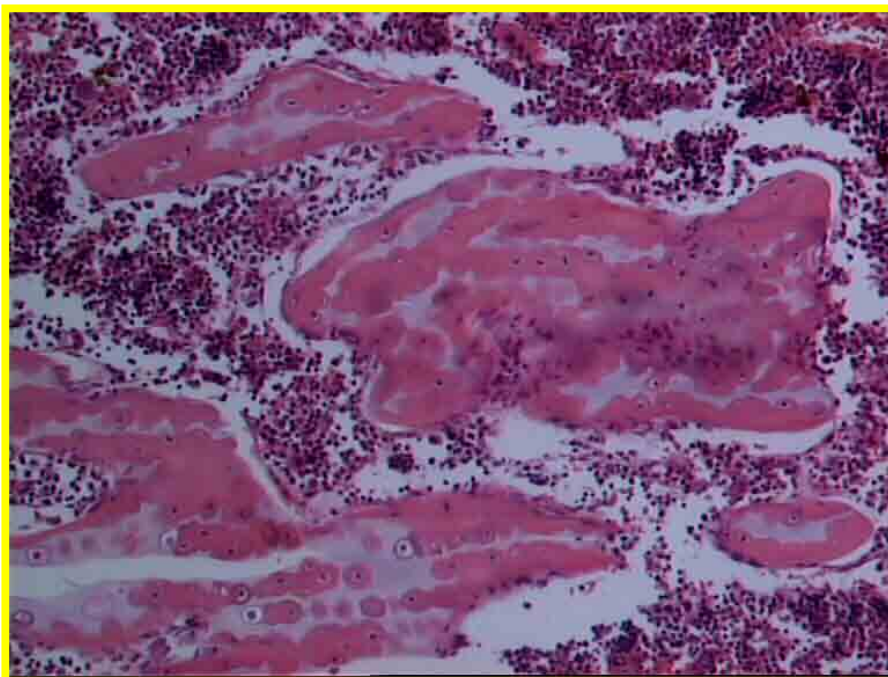


Figura 24 – Corte histológico de animal do grupo ooforectomia, três meses (HE, 20X).

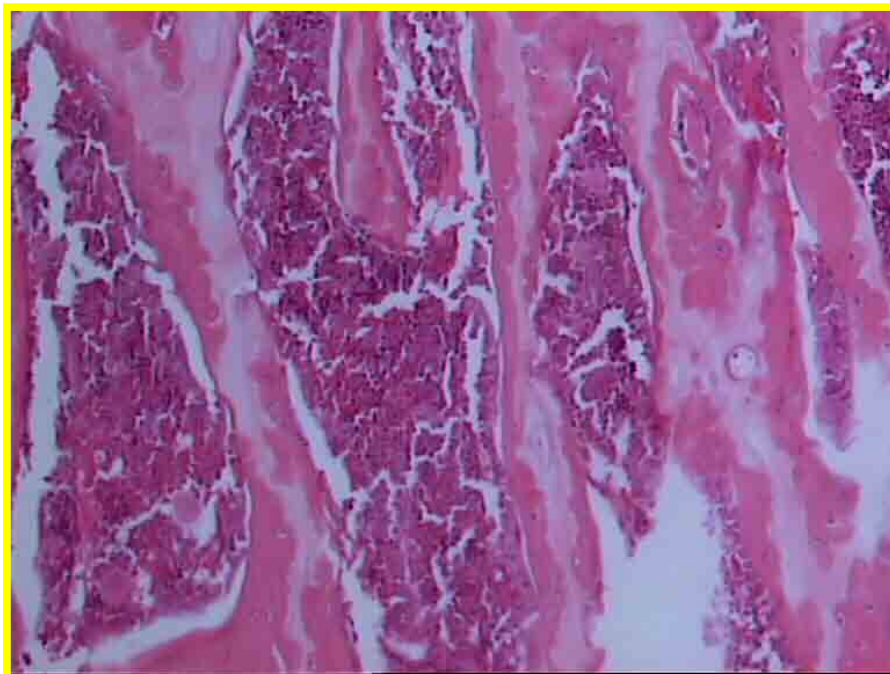


Figura 25 – Corte histológico de animal do grupo placebo, seis meses (HE, 20X).

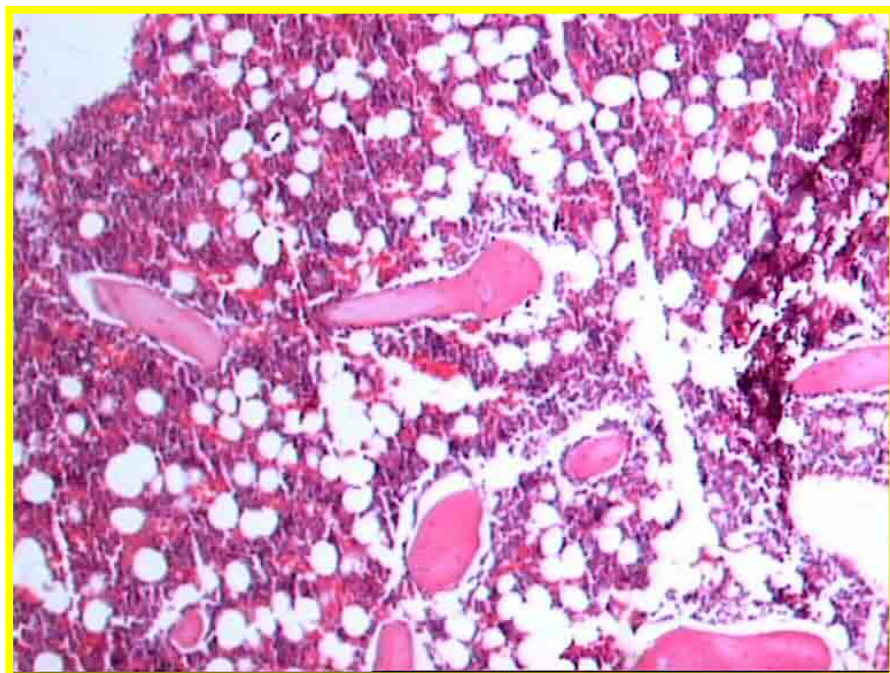


Figura 26 – Corte histológico de animal do grupo ooforectomia, seis meses (HE, 20X).





Figura 27 – Corte histológico de animal do grupo placebo, nove meses (HE, 20X).

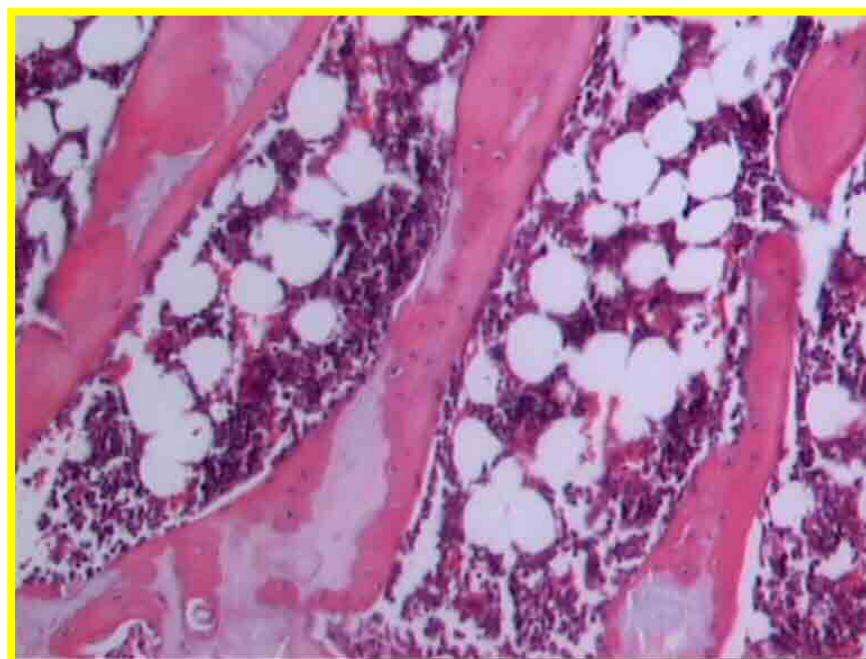


Figura 28 – Corte histológico de animal do grupo ooforectomia, nove meses (HE, 20X).

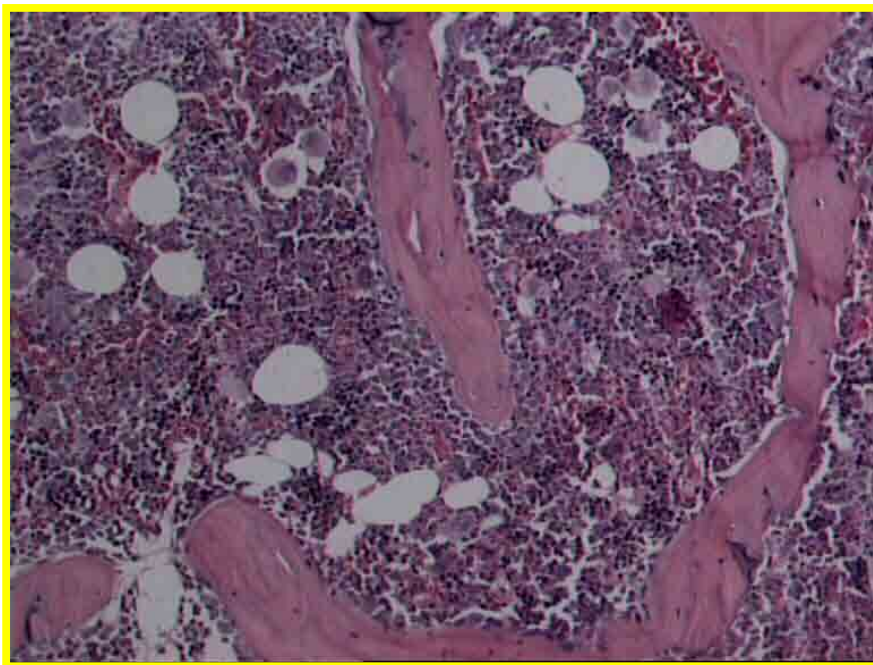


Figura 29 – Corte histológico de animal do grupo placebo, 12 meses (HE, 20X).

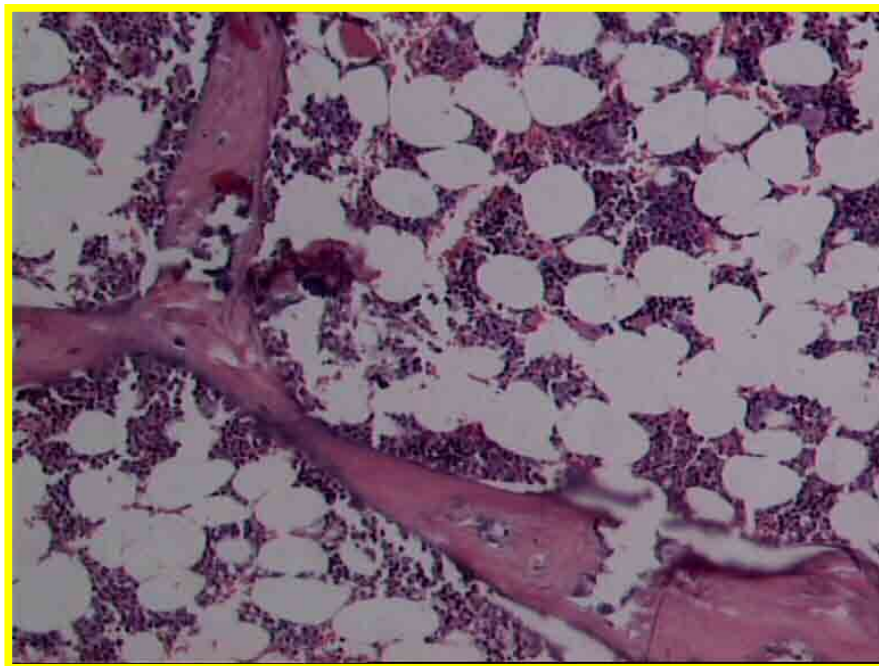


Figura 30 – Corte histológico de animal do grupo ooforectomia, 12 meses (HE, 20X).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 – Animal de Experimentação

O rato foi escolhido como animal de experimentação, neste trabalho, em razão da facilidade de obtenção, em biotério próprio, baixo custo de manutenção além de facilidade para alojamento e alimentação.

Além dos motivos citados, possui sistema músculo-esquelético semelhante aos dos seres humanos e, também, passa por período de menopausa, com alterações semelhantes às observadas em seres humanos. (THOMPSON et al., 1995; KAYE & KUSY, 1995; MARQUES & TAVEIRA, 1998). Apresenta ciclo de vida com tempo, bastante inferior ao do ser humano, permitindo o delineamento de estudos que tenham como objetivo observar todo o ciclo biológico, desde a infância até a senilidade (VOGEL, 1980).

### 4.2. Modelo de Menopausa

A ooforectomia foi escolhida como modelo de indução à osteoporose por reproduzir, possivelmente, as características do período pós menopausa, observadas em seres humanos. Embora a osteoporose possa ser induzida por vários outros modelos de agressão óssea, como etilismo, corticoterapia e outros, optou-se por este modelo em função do objetivo, ou seja, estudar, especificamente, alterações mecânicas e histológicas em situação de privação hormonal, típica da população feminina e de grande interesse clínico, conforme demonstrado na introdução (DEEBERG et al., 1978; THOMPSON et al., 1995; BAGI et al., 1997; KAYE et al., 1995; MARQUES et al., 1998; DESIDÉRIO, 1999).

A técnica utilizada é relativamente simples do ponto de vista cirúrgico e permite identificação macroscópica inequívoca dos ovários (PEREIRA\*, 2001). Não ocorreram complicações no pós-operatório, sendo que todos os animais evoluíram sem intercorrências. Diversos autores utilizaram metodologia

---

PEREIRA OCM (Departamento de Farmacologia. Instituto de Biociências do Campus de Botucatu. UNESP) Comunicação pessoal, 2001.

semelhante, como DIAS et al. (1982), PENG et al. (1994), MARQUES & TAVEIRA (1998), SITTA (1999), TURNER (1999), CALERO et al. (2000), URIU et al. (2000), PATHAS et al. (2000), CHEN (2001) e CARVALHO & CLIQUET (2003).

O objetivo da ooforectomia foi, portanto, reduzir a produção de estrógenos que são sintetizados majoritariamente pelos ovários e desta maneira induzir o desenvolvimento de osteopenia e osteoporose. Mesmo com a excisão bilateral dos ovários, não ocorre a interrupção total da produção de estrógeno, porque, também, ocorre síntese, em menor escala, nas supra-renais, além da reserva natural que existe no tecido gorduroso periférico que pode ser mobilizada (DIAS, 1982).

É evidente, entretanto, que, com a retirada dos ovários, a quantidade de estrogênio diminua consideravelmente ao longo do tempo.

A manutenção da massa óssea depende de vários outros fatores e não apenas do nível hormonal, mas como demonstrado por vários trabalhos, a perda da função ovariana tem potencial, mesmo isoladamente, para causar a instalação de osteoporose (GREENBLAT et al., 1976; FERNANDES, 1998; TURNER, 1999).

### **4.3. Delineamento**

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, placebo e ooforectomia com o objetivo de se isolar o efeito da privação hormonal.

A escolha dos tempos de sacrifício para estudo das variáveis, três, seis, nove e doze meses teve como objetivo permitir a caracterização das eventuais alterações ao longo da maior parte do ciclo de vida do animal.

As ratas são consideradas adultas aos 90 dias de idade e maduras do ponto de vista sexual aos 120 dias, segundo BOYCO & ZEBROWSKI (1972), FLIEGER et al. (1997) e LIANG et al. (1999). Outros autores afirmaram, porém, que a maturidade sexual é atingida com 50 a 60 dias (FARRIS, 1960) ou 45 a 147 dias (BECKER et al., 1979).

VOGEL (1980) afirmou que as ratas podem ser consideradas como adulto jovem, entre quatro e 12 meses e senis após 12 meses. Pode-se concluir, portanto, que há variedade de opiniões, que talvez sejam diferentes, em função da linhagem utilizada, condição de alimentação e outras.



Optou-se por realizar a ooforectomia aos 120 dias (quatro meses) de idade, por ser o tempo citado mais freqüentemente na literatura estudada e, também, por informações do nosso biotério, a respeito da idade de início de reprodução dos animais criados em nosso meio. Como os animais foram sacrificados em períodos de pós-operatório de três, seis, nove e 12 meses, apresentaram portanto, sete, dez, 13, e 16 meses de idade, respectivamente no momento de avaliação, tempos que devem abranger a quase totalidade do ciclo de vida do rato.

Segundo VOGEL (1980) os tempos utilizados, pela idade no momento do sacrifício, correspondem respectivamente ao período adulto jovem (sete meses), final do período adulto (10 meses), início da menopausa (13 meses) e senilidade (16 meses). Para este autor, a partir dos 13 meses de idade, inicia-se o processo de perda de massa óssea o que permite observação e comparação dos resultados obtidos pela ooforectomia com aqueles induzidos pelo envelhecimento.

Os trabalhos disponíveis na literatura consultada apresentam grande variação em relação ao instante da realização da ooforectomia, desde jovens até adultos jovens e, também, em relação ao tempo de sacrifício e, por extensão, do tempo de duração da agressão, bem como dos parâmetros estudados (PENG et al., 1994; MARQUES & TAVEIRA, 1998; LIANG et al., 1999; CALERO et al., 2000; GIAVARESI et al., 2000; CHEN et al., 2001). Também não há consenso a respeito do tempo necessário, após a castração cirúrgica, para a identificação e quantificação da perda de massa óssea (GUO & GOLDSTEIN, 2000).

PENG et al. (1994) realizaram a castração aos três meses de idade e sacrifício aos dois e sete meses de pós-operatório e encontraram diminuição da resistência do colo do fêmur.

MARQUES & TAVEIRA (1998) afirmaram que os animais de 60 e 90 dias de idade foram os mais adequados para a realização da ooforectomia em estudo morfológico das alterações ósseas do maxilar de ratas Wistar. Com quarenta dias de pós-ooforectomia encontraram alterações morfológicas, em microscopia óptica, no osso alveolar do maxilar causadas pela deficiência estrogênica.

LIANG et al. (1999), também, realizaram ooforectomia aos três meses de idade e com dois meses de pós-operatório observaram perda de massa óssea.

CALERO et al. (2000), com ooforectomia aos três meses de idade e sacrifício após três meses, não obtiveram diferenças nas propriedades mecânicas analisadas em ensaios de torção.

GUO & GOLDSTEIN (2000) encontraram perda óssea, nas trabéculas de L4, após realização de ooforectomia aos quatro meses de idade em estudo com cinco meses de pós-operatório, em relação ao controle não castrado.

GIAVARESI et al. (2000) utilizaram ratas com 10 meses de idade no instante da ooforectomia e sacrifício com quatro meses de pós-operatório e encontraram diferenças significativas, em relação ao controle, em avaliação de propriedades mecânicas e características histológicas.

Pelo exposto, pode-se considerar que a utilização de diferentes idades, no momento de realização da ooforectomia, bem como diferentes tempos de sacrifício e parâmetros estudados, tornam difícil a padronização de resultados e comparação. Os resultados da presente investigação devem ser, portanto, considerados como específicos para o delineamento e tempos adotados.

Acredita-se que a escolha, na presente investigação, de diversos tempos experimentais, abrangendo boa parte do ciclo biológico do rato, e estudo de diferentes parâmetros mecânicos e histológicos, possa contribuir para o entendimento e padronização do modelo de osteoporose induzida por menopausa e que, portanto, o delineamento adotado esteja adequado aos objetivos da investigação.

#### **4.4. Estudo Clínico**

A análise estatística relativa ao peso dos animais procurou testar a evolução ao longo do tempo dentro de cada grupo, e a comparação entre grupos em cada momento de sacrifício.

No grupo operado (ooforectomia) os animais ganharam peso ao longo do experimento, de maneira significativa, atingindo a maior média aos nove meses de pós-operatório. Neste instante o peso foi significativamente superior aos outros momentos, sendo que aos seis e 12 meses de pós-operatório não houve diferença.

Em relação ao grupo controle obteve-se resultado diferente e os animais não apresentaram ganho de peso em qualquer dos momentos avaliados, embora tenha sido notada discreta tendência ao ganho, porém, sem significado estatístico.

Concluiu-se, portanto, que a retirada dos ovários causou ganho de peso.

Estes resultados estão em conformidade com dados da literatura que atestam que, após o climatério, ocorre alteração do perfil lipídico em função de alteração não apenas da distribuição de tecido adiposo, causada pela deficiência de estrógenos mas, também, pelo acúmulo de gordura periférica (DIAS et al., 1982).

Este mecanismo talvez possa ser entendido, pelo fato de que mulheres obesas tolerem melhor a menopausa, que mulheres magras, pela capacidade das células adiposas de “armazenarem” hormônios transformando-se em fonte de reserva natural. O aumento da massa gorda funcionaria, portanto, como mecanismo de proteção (BALOG, 1978).

Vários estudos confirmaram experimentalmente, a associação entre ganho de peso e deficiência de estrógeno.

Achado semelhante foi obtido por MARQUES & TAVEIRA (1998) que obtiveram ganho de peso, no grupo castrado, em relação ao controle após 5, 10, 20, 30, e 40 dias de pós-operatório. Também BAGI et al. (1997) encontraram ganho de peso nas ratas ooforectomizadas após quatro, oito e 12 semanas de pós-operatório com alimentação livre.

LIANG et al. (1999) encontraram aumento de 12% do peso do grupo castrado, em relação ao controle, mesmo com restrição alimentar, após dois meses de pós-operatório. PENG et al. (1994) obtiveram, também, peso significativamente maior no grupo castrado, mesmo na vigência de exercícios. Estes trabalhos mostraram, portanto, que mesmo a menor oferta de alimento e o aumento de consumo, induzido pelo exercício físico, não podem compensar o ganho de peso induzido pela privação hormonal.

CARVALHO & CLIQUET (2003) em estudo comparativo entre grupos ooforectomia e controle, com pesos randomizados no início do experimento, procedimento não adotado na presente investigação, encontrou diferenças

significativas, após 30 dias de pós-operatório, resultado que mostra que o ganho de peso ocorre rapidamente.

É evidente, portanto, que embora o efeito da ooforectomia esteja ligado do ganho de peso, não parece operar de maneira homogênea ao longo do tempo, apresentando efeito máximo aos nove meses.

O motivo que explique este achado pode estar localizado no fato de aos 12 meses, o grupo controle, já na senilidade, apresente possivelmente menor ingestão alimentar em função da idade, embora este efeito não tenha sido suficiente para causar diferenças ao longo do tempo, dentro do próprio grupo. Outros autores, também, encontraram resultados semelhantes, atribuído, provavelmente, à associação entre menopausa e envelhecimento (JACOB, 1988; SITTA, 1999).

Concluiu-se, portanto, que a ooforectomia causou aumento de peso ao longo do tempo, embora a comparação com o controle tenha mostrado diferenças menos expressivas.

O resultado obtido pode, entretanto, ter sido influenciado, por variações entre os grupos, indicando que em estudos específicos sobre a relação entre menopausa e ganho de peso, os grupos devam ser escolhidos de maneira a resultar em médias de peso semelhantes no início do experimento e não por meio de sorteio aleatório.

## **4.5 - Estudo Biomecânico**

### **4.5.1 - Método de Ensaio**

Do ponto de vista da biomecânica o tecido ósseo é um composto bifásico com mineral em uma fase e material orgânico, principalmente colágeno, em outra (FRANKEL & NORDIN, 2003).

Segundo BASSET (1965), é semelhante, por exemplo, à fibra de vidro, em que um material forte e rígido é “embutido” em outro material diferente, e a combinação resultante é mais resistente que a soma total das duas fases separadamente. FRANKEL & NORDIN (2003) afirmaram também que as propriedades mecânicas mais importantes do osso são a resistência e a rigidez. É

evidente que estas propriedades só podem ser estudadas experimentalmente por meio de ensaio mecânico que permite observar o comportamento do osso submetido a carregamento. É, também, importante conhecer o comportamento mecânico, em situações como a osteoporose, porque só desta maneira pode-se estimar o risco de fratura, principal complicação da perda de massa óssea. A resistência e rigidez, portanto, só podem ser avaliadas por meio de ensaio mecânico em trabalhos experimentais. Análises histológicas e bioquímicas contribuem para a qualificação e quantificação da osteoporose, mas não permitem conclusões a respeito do comportamento frente às situações de exigência mecânica às quais é submetido o tecido ósseo diariamente.

O equipamento utilizado na presente investigação é do tipo eletromecânico o que confere grande precisão de resultados. Apesar da qualidade do equipamento, deve-se considerar que estas máquinas foram desenvolvidas para testes de materiais isotrópicos (metais, por exemplo), enquanto que materiais biológicos são de natureza viscoelástica (estrutura compostas por diferentes substâncias, incluindo fluídos, com múltiplas formas de arranjo). Os resultados obtidos, em toda investigação deste tipo, não são absolutos, mas os possíveis diante da limitação do método (MÜLLER, 1998).

As propriedades mecânicas escolhidas no presente estudo foram a carga máxima e coeficiente de rigidez.

A carga máxima é definida como a maior carga suportada pelo corpo de prova até a fratura .

O parâmetro acima citado foi informado pelo programa no relatório final do ensaio, que, também, forneceu o diagrama carga-deformação. A partir deste diagrama, aplicando-se o método de Johnson, obteve-se o coeficiente de rigidez (CHIAVERINI, 1986).

O coeficiente de rigidez é calculado a partir de uma reta na fase elástica da curva, traçada até o limite de proporcionalidade ou elasticidade. Após este ponto, inicia-se a fase plástica em que as deformações já são definitivas, ou seja, mesmo que o carregamento seja interrompido, o corpo de prova não retornará à dimensão inicial. A figura 31 apresenta o diagrama carga-deformação e as diversas regiões e pontos do traçado. A figura 32 mostra o método de cálculo do coeficiente de rigidez.

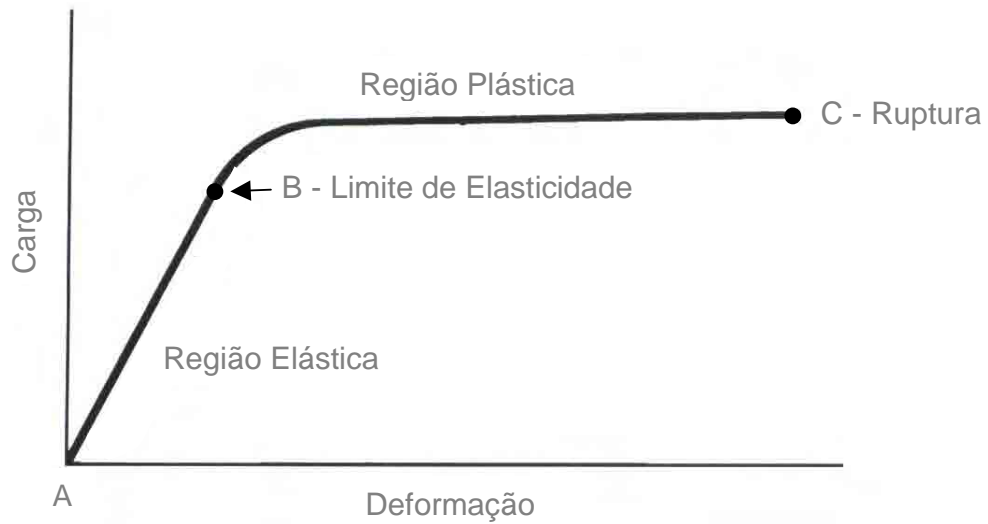


Figura 31: diagrama carga-deformação com as diversas regiões

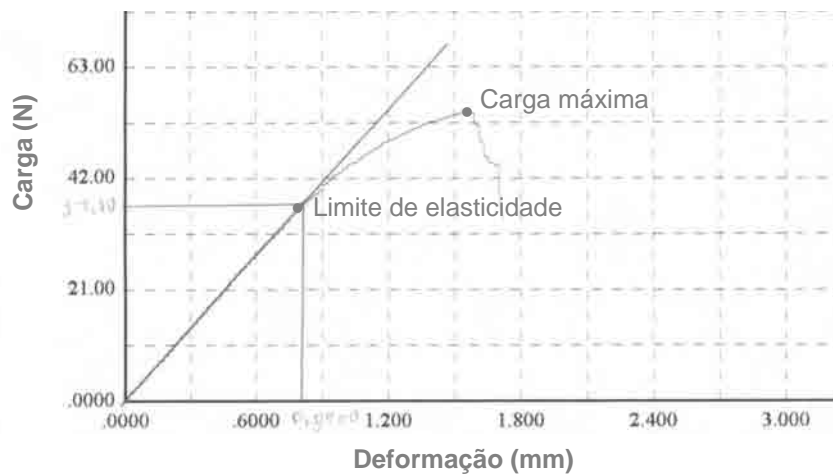


Figura 32: diagrama carga-deformação incluindo o trecho reto utilizado para cálculo do coeficiente de rigidez

As variáveis escolhidas, carga máxima, e coeficiente de rigidez são consideradas propriedades estruturais, isto é, relativas à tibia do rato e são representativas do limite de utilização (carga máxima) e da estabilidade da estrutura (coeficiente de rigidez ou constante de proporcionalidade). Para estudo de propriedades estruturais como tensão, módulo de elasticidade e outras, seria necessário o conhecimento da área de secção do corpo de prova, cálculo que foi evitado, em função da irregularidade anatômica da tibia e dos prováveis erros inerentes ao cálculo.

O osso pode ser carregado de diferentes maneiras: tensão, compressão, flexão, cisalhamento, torção ou em combinações de cargas, segundo FRANKEL & NORDIN (2003).

Estes autores descreveram o ensaio de flexão em três pontos, utilizado na presente investigação, como carregamento que causa flexão ou “envergamento”, do corpo de prova até a fratura.

O método de ensaio de flexão em três pontos está ilustrado na figura 33.

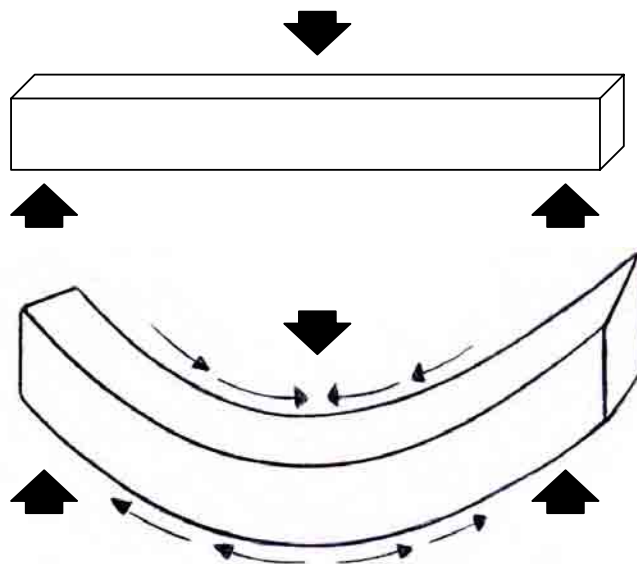


Figura 33: Método de ensaio de flexão em três pontos.

A ilustração mostra que durante o carregamento em flexão um dos lados do corpo de prova sofrerá tensão e deformação (face convexa) e a outra compressão e deformação, face côncava (FRANKEL & NORDIN, 2003). Segundo estes autores, nos ensaios de flexão em três pontos, três forças agem no corpo de prova produzindo dois momentos iguais e a fratura ocorre tipicamente no ponto de aplicação de carga.

É fundamental, portanto, que em todos os ensaios seja padronizado o local de colocação dos apoios e que a carga seja aplicada em ponto equidistante das extremidades. Os resultados obtidos são, portanto, específicos para este tipo de ensaio.

Como o tecido ósseo é viscoelástico, os resultados obtidos dependem não apenas da forma como o carregamento foi realizado mas, também, da velocidade da aplicação de carga. Na presente investigação foi utilizada a velocidade de 30 mm/min, considerada média (SMITH et al., 1993). Este autor afirmou, também, que com o aumento da velocidade ocorre aumento dos valores das propriedades mecânicas. A escolha desta velocidade baseou-se na capacidade e tipo de máquina utilizada (eletromecânica), que não permite ensaios de alta velocidade (impacto). Outra vantagem é que ensaios, em baixa e média velocidade, são mais seguros e permitem resultados mais homogêneos. O ensaio de flexão em três pontos, também foi escolhido pelos mesmos motivos e, também, pela experiência acumulada no laboratório utilizado (MÜLLER et al., 2004).

É importante ressaltar que os resultados obtidos são específicos para as condições observadas, o que torna, muitas vezes, difícil a comparação com outros trabalhos que também utilizaram métodos distintos. Diversos trabalhos foram encontrados na literatura que utilizaram ensaios mecânicos em ratas ooforectomizadas para verificar os efeitos na massa óssea.

CALERO et al. (2000) utilizaram ratas com três meses de idade e após três meses de pós-operatório não observaram resultados com diferenças significativas nos parâmetros mecânicos de ensaio de torção com velocidade de 10 mm/min, quando comparados ao controle.

GUO & GOLDSTEIN (2000) utilizaram a técnica de nanoidentação para estudos das propriedades mecânicas de módulo de elasticidade e resistência, na vértebra L4 em ratas, e não encontraram alterações significativas no operado em



relação ao controle, após cinco meses de ooforectomia realizada aos quatro meses de idade.

GIAVARESI et al. (2000) observaram diminuição nos parâmetros mecânicos de carga máxima e módulo de elasticidade na velocidade de 1mm/min, na vértebra L5, quando comparados ao controle em ratas com 10 meses de idade e após quatro meses de ooforectomia. JIANG et al. (1999) realizaram estudo semelhante associado a injeções de hormônios em ratas com quatro meses e meio de idade e após três, seis e nove meses de pós-operatório realizaram teste de compressão em L1 e torsão no fêmur e constataram redução dos valores no grupo ooforectomizado que, mesmo com a administração dos hormônios, não retornou ao perfil mecânico original.

Outros autores utilizaram o ensaio de flexão de três pontos, em ratas ooforectomizadas, para estudo das repercussões mecânicas. PENG et al. (1994) verificaram a carga máxima em ensaios no fêmur, entre os grupos placebo e ooforectomia. SITTA (1999) utilizou os parâmetros de carga máxima e coeficiente de rigidez com velocidade de cinco mm/min em diferentes grupos treinados com peso e corrida.

Pode-se considerar, pelas informações presentes na literatura, que a escolha do ensaio de flexão em três pontos esteja adequada aos objetivos do presente estudo, embora não seja o único método disponível.

#### **4.5.2- Carga Máxima**

Como citado anteriormente a carga máxima é definida como a maior carga suportada até a fratura, ou seja, o limite de resistência. É, talvez, o parâmetro mais utilizado nos estudos de propriedades mecânicas do osso (MYBURGH et al, 1989).

A análise estatística dos resultados mostrou que ambos os grupos, ooforectomia e controle, não apresentaram alterações significativas ao longo do tempo. Na comparação entre grupos, em cada tempo, apenas no momento M2 (seis meses de pós operatório), o placebo exibiu carga máxima significativamente superior ao grupo ooforectomia.

Nos outros momentos embora o valor médio do controle fosse superior aos do grupo castrado, em valores absolutos, as diferenças não atingiram nível de significância.

O resultado mostra, portanto, que três meses de pós-operatório não foram suficientes para a indução de perda de resistência, que ocorreu, entretanto, aos seis meses, retornando, à igualdade estatística aos nove e doze meses. A explicação para estes resultados podem estar em vários fatores que podem ter influenciado, como o valores dos desvio-padrão obtidos, muito variáveis, provavelmente em função de características da amostra e respostas individuais à privação hormonal.

O mais provável, entretanto, é que nos grupos de sacrifício aos nove meses (13 meses de idade) e doze meses (16 meses de idade), tenha ocorrido perda progressiva da massa óssea como parte do processo natural de envelhecimento, fato que "igualou" o comportamento mecânico, embora o grupo castrado estivesse privado do fator hormonal há mais tempo. Esta teoria pode explicar apenas parcialmente o resultado obtido que deve estar associado, mais provavelmente, ao método de ensaio. Como foi utilizado ensaio de flexão, a aplicação de carga ocorreu no ponto médio de região diafisária, composta majoritariamente por osso cortical compacto.

É conhecido que as alterações ósseas decorrentes da menopausa atingem mais rapidamente e de forma mais intensa o osso trabecular esponjoso presente nas extremidades ósseas (SIFFERT & LEVY, 1979). Este fato pode explicar que a incidência de fraturas na osteoporose ocorra de maneira absoluta nestas regiões anatômicas, porção proximal do fêmur e distal do rádio, por exemplo.

Pode se imaginar, portanto, que o osso cortical compacto, seja mais estável e resistente às alterações induzidas pela menopausa mesmo no processo natural de envelhecimento, o que explicaria o resultado obtido e a menor incidência de fraturas na região diafisária, mesmo em casos de osteoporose severa.

A demonstração das alterações mecânicas próprias da osteoporose pós menopausa exigira, portanto, métodos de ensaios diferentes, submetendo especificamente as regiões das extremidades, com aplicação da carga em

compressão. De qualquer forma, o resultado obtido indica que o comportamento mecânico do osso pode ser distinto para diferentes regiões e que a porção cortical pode ser menos exposta à privação hormonal, apesar da diferença significativa, induzida pela ooforectomia, aos seis meses de pós-operatório, igualada mais tarde, provavelmente, pelo processo de envelhecimento.

Trabalhos que investigaram alterações mecânicas causadas pelo envelhecimento, no rato, também chegaram à conclusão semelhante (VOGEL, 1980; JACOB, 1988; SITTA, 1999), e reforçam a idéia de que o perfil mecânico está associado, não apenas ao nível hormonal, mas, também, a outros fatores como idade, alimentação, atividade, e outros além do método de estudo utilizado.

Outros autores, em investigações sobre os efeitos da menopausa nas propriedades mecânicas, de ossos de ratos, com delineamentos diferentes em relação à idade do animal, tempo de observação, osso e região anatômica utilizada além do método de ensaio, chegaram à conclusões variáveis.

PENG et al. (1999) encontraram diminuição da carga máxima, em ratas submetidas à ooforectomia aos três meses de idade e avaliadas após oito e 18 semanas, em ensaios realizados no colo do fêmur.

PENG et al. (1997) demonstraram redução da carga máxima, em modelo de ooforectomia, que foi compensada com treinamento físico em esteira.

SITTA(1999) também obteve diminuição da carga máxima em ensaio de flexão no fêmur de ratas submetidas à ooforectomia e avaliadas aos três, oito e 18 meses de idade.

GIAVARESI et al. (2000) avaliaram a carga máxima em ensaio de compressão na vertebra L5, em ratas submetidas à ooforectomia aos dez meses de idade, e após quatro meses encontraram redução significativa da resistência em relação ao controle.

Pelos dados da literatura pode-se constatar que, de maneira geral, há concordância em relação do fato da privação hormonal induzir à perda da resistência que manifesta-se, entretanto, de diferentes maneiras conforme o método de ensaio e principalmente conforme o osso e região estudada.

Na presente investigação foi possível observar perda significativa da resistência apenas aos seis meses de privação hormonal. O comportamento de ambos os grupos, ooforectomia e placebo foi semelhante aos nove e 12 meses

provavelmente em função do envelhecimento do controle. É preciso ressaltar, também, que estes resultados estão certamente relacionados ao comportamento específico do osso diafisário composto, predominantemente, pelo tipo cortical, que talvez seja mais estável e menos exposto à privação hormonal que o tecido esponjoso.

Os tempos de avaliação também parecem ter influência nos resultados com tendência do envelhecimento natural "igualar" o dano produzido pela privação hormonal.

#### **4.5.3- Coeficiente de Rigidez**

O coeficiente de rigidez ou constante de proporcionalidade ( $k$ ) calculado no trecho reto do diagrama carga-deformação, no segmento da fase elástica é representativo da estabilidade da estrutura. Corpos de prova diferentes podem, por exemplo, exibir carga máxima semelhante e rigidez diferente, dependendo da inclinação do trecho reto da curva.

A análise estatística deste parâmetro mostrou que ambos os grupos, placebo e ooforectomia, apresentaram evolução semelhante do longo do tempo e os valores só foram significativamente maiores aos doze meses de pós-operatório, quando os animais tinham dezesseis meses de idade em ambos os grupos. A comparação entre grupos, em cada momento, isolando, portanto, o efeito da ooforectomia, mostrou que o placebo apresentou valores significativamente superiores aos três, seis e doze meses e semelhantes aos nove meses.

Pode-se afirmar que a deficiência hormonal causou, portanto, diminuição da rigidez e que o efeito de tempo (envelhecimento) foi menos pronunciado.

Inicialmente, é difícil encontrar explicação para o comportamento semelhante apenas aos nove meses (M3), podendo se tratar de achado casual, já que nos outros tempos as diferenças foram significativas. Ou que, talvez, o fator envelhecimento a partir dos treze meses de idade, época de início da menopausa tenha tido alguma interferência. O comportamento do grupo castrado, semelhante aos três, seis, e nove meses, com rigidez maior aos doze meses, também, pede

explicação, que pode, a exemplo da carga máxima, estar relacionada ao fato do ensaio ter solicitado a porção cortical do osso.

Estudando a diminuição da massa óssea que ocorre em função do envelhecimento, KAPLAN et al. (1994) demonstraram a relação entre massa óssea e idade em secção transversal do fêmur humano ilustrado na figura 34.

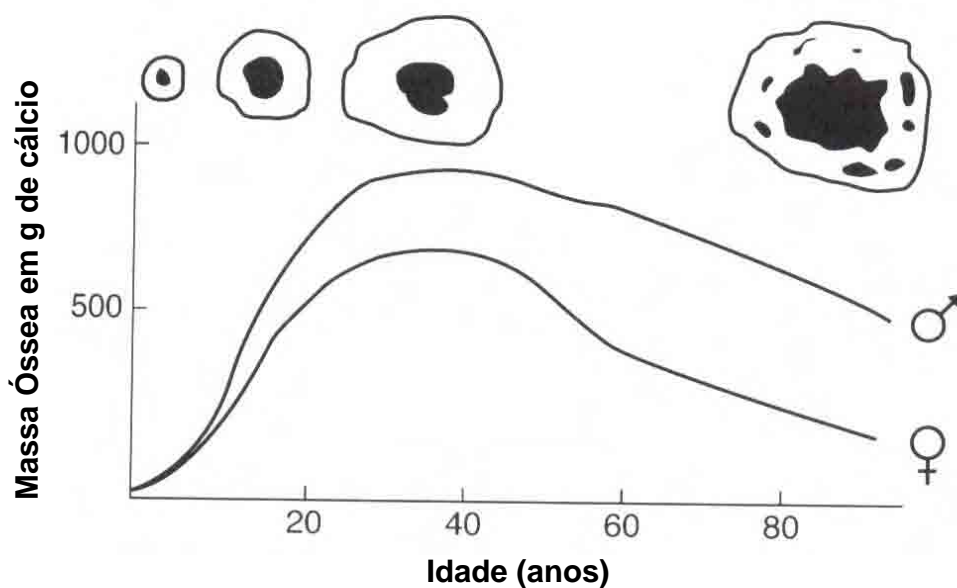


Figura 34: Diagrama da relação entre massa óssea, idade e sexo, acompanhada da secção transversal da diáfise do fêmur (adaptado de KAPLAN et al., 1994).

A análise da investigação citada permite supor que ocorre afinamento da cortical por diminuição da massa óssea que pode, também, estar associada à diminuição da quantidade de água e outras modificações da composição bioquímica.

Em estudo semelhante, em tíbias humanas, de diferentes idades, BURSTEIN et al. (1976), conforme ilustrado na figura 35, concluíram que a resistência (carga máxima) era semelhante nas duas idades (jovem e idoso), mas o osso velho era mais “quebradiço” característica do material “frágil” e portanto com rigidez alterada.

O aumento da rigidez deve ser interpretado como a capacidade do corpo de prova em romper com menor deformação, típica dos materiais "frágeis" como o vidro, por exemplo.

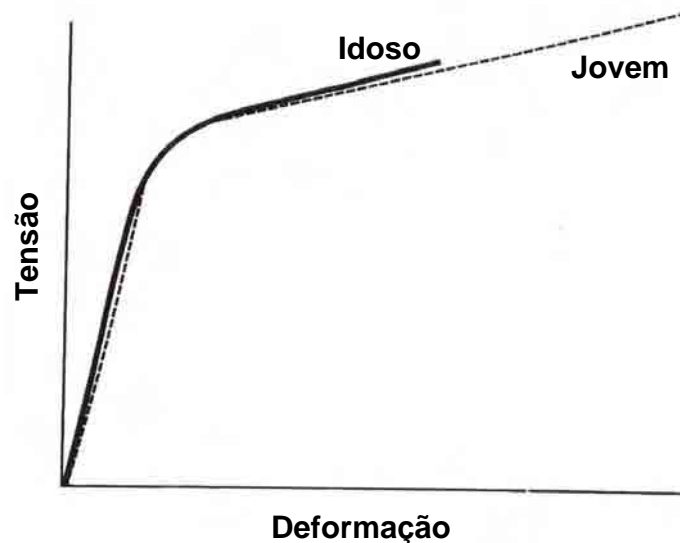


Figura 35: Diagrama tensão-deformação para duas amostras de tíbia humana em diferentes idades (adaptado de BURSTEIN et al., 1976).

Estes estudos indicam que além do fator hormonal o fator envelhecimento deve ter contribuído para o resultado obtido em que a carga máxima suportada foi semelhante, porém com rigidez diferente, principalmente aos 16 meses de idade. Deve-se ressaltar, também, que parece evidente o papel da privação hormonal na diminuição da rigidez nos grupos mais jovens, com sete e dez meses, sacrificados após três e seis meses de pós operatório respectivamente.

SITTA (1999) em ensaio de flexão realizado em fêmur de ratas ooforectomizadas, também, encontrou alterações da rigidez.

GUO & GOLDSTEIN (2000) avaliaram ratas submetidas à ooforectomia aos quatro meses de idade e sacrificadas após cinco e nove meses de cirurgia quando os animais apresentaram nove e 13 meses de idade respectivamente; utilizaram ensaio de compressão na vértebra L4 e não encontraram diferenças

significativas no coeficiente de rigidez, em relação do controle, embora o estudo morfológico tenha identificado perda de massa óssea.

CARVALHO & CLIQUET (2003) estudaram o efeito da ooforectomia, por meio de ensaio de flexão no fêmur de animais sacrificados após 30 dias de cirurgia e não encontraram diferenças significativas no coeficiente de rigidez em relação ao controle.

A análise da literatura mostra que os delineamentos são bastante variáveis e que nem sempre o efeito da privação hormonal pode ser relacionado diretamente à alteração da rigidez. É provável que modificações da rigidez estejam ligadas, a exemplo da resistência (carga máxima), ao tipo de carregamento e à região anatômica testada, osso diafisário ou metafisário e ao tempo de privação hormonal ou envelhecimento, fatos que tornam difícil a comparação entre os diversos trabalhos.

De qualquer forma, os resultados da presente investigação mostraram que a deficiência de estrógeno pode alterar o coeficiente de rigidez da porção diafisária e, também, que a alteração desta propriedade mecânica não parece estar relacionada diretamente à resistência máxima. Estes resultados indicam, mais uma vez, a necessidade de padronização dos métodos de investigação para esclarecimento do desempenho mecânico das diferentes regiões ósseas em situação de privação hormonal e envelhecimento.

## **4.6 - Estudo Histológico**

### **4.6.1 - Histomorfometria (área trabecular)**

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, constituído por células, fibras, substância fundamental e material intercelular calcificado, a matriz óssea. É um dos tecidos mais resistentes e rígidos do corpo humano, serve de apoio para os músculos esqueléticos e proteção de órgãos vitais e desempenha importante função metabólica, de armazenamento de cálcio.

Fisiologicamente a matriz óssea é composta de elementos orgânicos (colágeno) e inorgânicos (minerais).

Os elementos orgânicos da matriz são formados por fibras colágenas (95%), constituído de colágeno Tipo I e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa que contém proteoglicanas e glicoproteínas. No interior da matriz estão os osteóides no qual são produzidos pelas células denominadas osteoblastos que sintetizam a parte orgânica.

Os elementos inorgânicos são constituídos principalmente de hidroxiapatita, fosfato, cálcio e outros minerais como sódio, potássio, carbonato e fluoreto, nos quais desempenham importante papel estrutural e metabólico.

A dureza e a resistência do tecido ósseo são devido a associação de hidroxiapatita com as fibras de colágenas.

O conteúdo mineral ósseo é armazenado tanto no osso cortical (compacto) como no esponjoso.

A área trabecular foi calculada na metáfise, região proximal da tíbia, próxima ao disco epifisário, em função desta região ser a mais indicada para este tipo de estudo, pelo predomínio de osso esponjoso. Na literatura foram encontrados vários trabalhos que utilizaram esta região (BARENGOLTS et al., 1994; LIANG et al., 1999; CHEN et al., 2001).

A análise estatística dos resultados mostrou que houve redução significativa ao longo do tempo, no grupo ooforectomia, porém de maneira não uniforme. O valor da área é maior aos três meses em relação aos outros instantes. Nos momentos M2 e M3, os valores são semelhantes e discretamente inferiores a M4. Em todos estes momentos (M2, M3 e M4) há redução significativa em relação a M1, ou seja, após perda significativa a partir dos seis meses de privação hormonal houve tendência à manutenção da área trabecular, mesmo considerando-se que em M3 e M4 possa ter ocorrido associação entre o efeito da ooforectomia e do envelhecimento.

No grupo placebo, também, constatou-se diminuição significativa da área ao longo do tempo, havendo semelhança nos momentos M2 e M3. A comparação entre os momentos M1 e M4 mostrou redução bastante significativa da área trabecular, provavelmente em função do envelhecimento e da instalação da menopausa natural. THOMPSON et al. (1995) e PATHAS et al. (2000) afirmaram que após 12 meses de idade o comportamento do osso trabecular dos controles tende a ficar semelhante ao grupo ooforectomia. MARQUES & TAVEIRA



(1998), também, concluíram que há relação direta entre envelhecimento e os efeitos da menopausa no tecido ósseo.

A comparação entre grupos ooforectomia e placebo, fixado o momento, revelou que a menopausa induzida gerou diminuição da área trabecular de forma significativa nos momentos M2, M3 e M4. Apenas em M1 os dois grupos apresentaram comportamento semelhante. Estes resultados apontam em primeiro lugar para o efeito deletério da privação hormonal no osso trabecular e, também, mostram que mesmo o efeito do envelhecimento e da menopausa natural, presentes no grupo placebo, principalmente em M3 e M4, não foram suficientes para gerar redução da área trabecular maior do que os animais expostos à privação hormonal por longo período.

A comparação entre os grupos ooforectomia e placebo deixa evidente que no primeiro momento não houve diminuição da área trabecular no grupo operado, pois certamente o tempo de ausência de estrógeno no operado não foi suficiente para grandes perdas na massa óssea, e, nos demais momentos houve redução significativa na área das trabéculas. No segundo momento e no terceiro momento, as diferenças entre o placebo e ooforectomia foram semelhantes, com o mesmo nível de significância; no M2, o tempo de seis meses de ausência de estrógeno foi, provavelmente, suficiente para aumento da reabsorção óssea. No quarto momento foi evidente a redução das trabéculas no grupo ooforectomia, quando comparado ao controle, mostrando que o efeito da privação hormonal ao longo do tempo teve papel mais importante que as possíveis alterações causadas pelo envelhecimento.

O osso trabecular apresenta estrutura semelhante ao “favo de mel”, formado por lâminas horizontais e verticais que se interconectam. Estes aspectos têm relação com as propriedades mecânicas do osso. A remodelação óssea no processo de envelhecimento tem, como resultado, estreitamento das lâminas, com eventual dissolução do tecido e perda da continuidade estrutural. Isto ocorre inicialmente nas trabéculas horizontais, diminuindo a resistência, e conseqüentemente aumentando o risco de fraturas (NOVELOVITZ, 2001).

No presente estudo, na medida da área trabecular foi possível observar a diminuição e perda da continuidade das trabéculas que aumentaram ao longo do

tempo principalmente no grupo ooforectomia embora este achado não tenha sido analisado do ponto de vista da histomorfometria.

Vários trabalhos da medida da área trabecular investigaram a deficiência do estrogênio em ratas, utilizando a histomorfometria como método de investigação. No entanto, os estudos variam na escolha da idade do animal, tempo de avaliação, tipo e local de análise no osso. (PENG et al., 1994; BARENGOLTS et al., 1994; MARQUES & TAVEIRA, 1998; LIANG et al., 1999; GUO & GODSTEIN, 2000; CHEN et al., 2001).

Ambas as espécies, ratos e humanos apresentam grande quantidade de osso trabecular no colo do fêmur e na região proximal da tíbia. PENG et al. (1994) ao analisar grupos de ratas ooforectomizadas e placebo com e sem exercícios, mostrou que a ooforectomia reduziu a área trabecular do colo do fêmur, em ratas com três meses de idade e sacrificadas com cinco e dez meses de idade ou seja após dois e sete meses de idade respectivamente. Neste trabalho as ratas estavam em idade adulta jovem e com seis meses de deficiência de estrógeno, foi possível verificar a redução da área das trabéculas ósseas, sugerindo que a diminuição da massa óssea ocorre com este tempo. Os achados encontrados por PENG et al. (1994) são semelhantes aos da presente investigação, embora o estudo tenha sido no colo do fêmur e no presente estudo na porção proximal da tíbia, provavelmente em razão da privação hormonal, neste modelo, atingir todos os ossos de maneira sistêmica.

BARENGOLTS et al. (1994) utilizaram ratas com nove meses de idade e, após três meses de ooforectomia, encontraram diminuição da área trabecular no grupo ooforectomia em relação ao placebo na metáfise proximal da tíbia, portanto os resultados são concordantes com o presente estudo.

MARQUES & TAVEIRA (1998) realizaram ooforectomia em ratas com um mês de idade e verificaram reabsorção dos septos ósseos no maxilar das ratas, após os tempos experimentais de cinco, dez e 30 dias de pós-ooforectomia. Observaram que houve reabsorção óssea apenas no grupo de 30 dias de pós-ooforectomia. Mesmo no animal jovem, o efeito da ooforectomia com 30 dias foi suficiente para resultar em reabsorção óssea no maxilar das ratas.

LIANG et al. (1999) verificaram, em ratas com três meses de idade ooforectomizadas e sacrificadas após dois meses (cinco meses de idade), a

repercussão da deficiência do estrogênio na região da metáfise proximal da tíbia. Concluíram que o volume ósseo esponjoso foi mais baixo no ooforectomizado e estes achados, também, coincidem com os do presente estudo.

Ocorrência de osteoporose, também, foi observada em ratas, com diminuição no nível de estrógeno nos estudos de GUO & GOLDSTEIN (2000); os autores utilizaram ratas com quatro meses de idade no instante da ooforectomia, sacrificadas com nove meses de idade, portanto após cinco meses de ausência de estrogênio, e estudaram as alterações morfológicas por meio de microscopia eletrônica e técnica de nanoindentação na vértebra L4. Concluíram que houve perda do osso trabecular do grupo operado em relação ao controle.

GIAVARESI et al. (2000) utilizaram ratas com dez meses de idade e após quatro meses estudaram dois parâmetros na vértebra L5: área e espessura trabecular. Concluíram que a área trabecular foi menor, em relação ao placebo, mas que as alterações da espessura não foram significativas.

PATHAS et al. (2000) observaram os efeitos da ooforectomia em ratas maduras na diáfise, metáfise e epífise óssea. Foi observada diminuição significativa das trabéculas ósseas apenas na metáfise óssea em ratas jovens e maduras com um, três e seis meses de idade. Concluíram que a ooforectomia exerce mudanças significativas no osso trabecular de ossos longos, principalmente nas extremidades.

CHEN et al. (2001) observaram, em ratas ooforectomizadas com cinco meses de idade, que, após dois meses, houve diminuição na arquitetura do osso trabecular, por meio de três parâmetros: área, espessura e número de trabéculas em diferentes regiões da metáfise proximal da tíbia em relação ao controle e encontraram diferenças significativas em todos os parâmetros.

Estes achados são semelhantes ao estudo de CARVALHO & CLIQUET (2003), que utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para observar as diferenças estruturais nas trabéculas ósseas, do fêmur, no grupo oofectomizado e placebo em ratas maduras e após 30 dias de ooforectomia. As trabéculas existentes no fêmur de ratas ooforectomizadas estavam mais espaçadas e com as conectividades reduzidas.

Os resultados do estudo histológico parecem mostrar, portanto, que a privação hormonal compromete o tecido ósseo da região metafisária e, também,

que as repercussões da deficiência de estrógeno talvez sejam mais importantes que o prejuízo causado pelo envelhecimento natural. O efeito da privação hormonal parece, também, relacionado ao tempo da agressão, com alterações mais intensas nos primeiros seis meses seguidas por aparente estabilização.

Finalizando o resultado da medida da área de osso trabacular indica que ambos, privação hormonal e envelhecimento, atuam de maneira desfavorável no osso metafisário, ainda que a análise deste tipo de variável apresente dificuldades de ordem metodológica.

#### **4.4 – Considerações Finais**

A utilização simultânea de parâmetros clínicos, biomecânicos e histológicos, na presente investigação, permitiu concluir que a retirada dos ovários produz alterações sistêmicas, caracterizadas por mudanças metabólicas que causaram ganho de peso e por modificações no tecido ósseo, associadas à alterações do perfil mecânico e redução da massa óssea. Não foi possível estudar as eventuais correlações entre atributos mecânicos e histológicos em razão destes estudos terem sido realizados em região anatômicas diferentes.

Aparentemente as porções metafisária, composta majoritariamente por osso esponjoso, e diafisária, onde predomina o osso cortical, respondem de maneira diferenciada à privação hormonal e ao envelhecimento.

É possível considerar, também, que a região metafisária sofra alterações de maneira mais intensa e precoce que a região diafisária em situação de privação hormonal.

As conclusões obtidas abrem a perspectiva de novos estudos com proposta que incluam análises mecânicas e histológicas da mesma região anatômica e que possam desta maneira avaliar a associação entre as alterações e arquitetura e o correspondente perfil mecânico.

É preciso afirmar que deve haver atenção especial e permanente com a extrapolação de resultados de investigações experimentais para a prática em seres humanos. Além das diferenças entre espécies, na prática médica há pacientes com perfis muito diferentes em relação à genética, nutrição, prática de

atividade física e outros tantos que certamente tornam a instalação da osteoporose e suas conseqüências motivo de avaliação individualizada.

De qualquer maneira o estudo das alterações mecânicas e histológicas só é possível experimentalmente e esse tipo de investigação deve continuar avançando no sentido de se conhecer mais detalhadamente a fisiopatologia da osteoporose além das estratégias mais adequadas para prevenção e tratamento já que parecem inevitáveis o aumento de incidência, em razão da elevação da expectativa de vida, e conseqüente aumento da freqüência de fraturas e complicações associadas.

## 5. CONCLUSÃO

Em ratas e nas condições da presente investigação, a menopausa induzida por ooforectomia bilateral teve como efeito:

- Ganho de peso corpóreo;
- Diminuição da resistência óssea do osso diafisário ao seis meses de privação hormonal;
- Diminuição da rigidez do osso diafisário;
- Redução da massa óssea da região metafisária.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Albright JF, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. *Am J Med Assoc* 1941; 116: 2465-74.

Aleixo NA. Contracepção no climatério. *Feminina* 1999; 92: 261-9.

American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). Preventing hip fractures 2001. Disponível em em: <http://orthoinfo.aaos.org>. acesso em: 12 março, 2003.

Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 336-44.

Balog J. Obesity and estrogen. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130: 1734-5.

Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kurreja SC. Effects of endurance exercise on bone mass and histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner* 1994; 26: 133-40.

Basset CAL. Electrical effects in bone. *Sci Am* 1965; 213: 18-23.

Becker RD, Terry BC, Hill C, Davis WH. Long-term results of alveolar ridge augmentation. *J Oral Surg* 1979; 37:486-9.

Bellino EL. Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 2000; 2:14-24.

Bennell K, Page C, Khan K, Warmngton S, Plant D, Thomas D et al. Effects of resistance training on bone parameters in young and mature rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 2:8-94.

---

\* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *Ann Intern Méd* 1997; 126:36-47.  
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

Bengner U, Johnell O, Redlund-Johnell I. Changes in incidence and prevalence of vertebral fractures during 30 years. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 293-6.

Boyko J, Zebrowski EJ. Influence of age, ovariectomy and submandibular-sublingual sialoadenectomy on submandibular gland metabolism in sexually and immature female rats. *Arch Oral Biol* 1972; 17: 1021-8.

Burstein AH, Reilly DT, Martins M. Aging of bone tissue: Mechanical properties. *J Bone Joint Surg* 1976; 58A, p.82-8.

Calero JA, Curiel MD, Moro MJ, Carrascal MT, Santana JSR, Avial MR. Speed of sound, bone mineral density and bone strength in ooforectomized rats. *J Eur Invest* 2000; 30: 210- 4.

Carvalho DCL, Cliquet A. Ação do ultra som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras* 2003; 11: 17-24.

Chen JL, Yao W, Frost HM, Li CY, Setterberg RB, Jee WSS. Bipedal stance enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effect on bone formation in sham and ovariectomized rats. *Bone* 2001; 29:126-33.

Chiaverini V. Resistência à tração e resistência à compressão. In: *Tecnologia mecânica*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1986; p.93-117.

Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE. Risk factors for hip fracture in white women. *N Engl J Med* 1995; 332: 767-73.

Cutson TM, Meuleman E. Managing Menopause. *Am Fam Physician* 2000; 61: 1391-99

Davicco MJ, Molteni MN, Meunier NG, Lebecque P, Coxam V, Barlet JP. Endurance training and bone metabolism in middle aged rats. *Metch Ageing Dev* 1998; 109: 83-96.



Deeberg F, Pitter MW, Rapp K. Longevity study in han: Wistar rats. Experience in maintaining aging rats for gerontological investigations. *Interdiscipl Topics Gerontol* 1978; 13: 66-74.

Desidério IP. Neoformação óssea em ratas ovariectomizadas: avaliação radiográfica e microscópica. [Dissertação]. Marília: Faculdade de Medicina de Marília- Unimar, 1999.

Dias R, Luca LA, Ramos MD, Antonini FR, Rudge MVC. Avaliação da atividade estrogênica após a menopausa. *J Bras Ginecol* 1982; 92: 261-9.

Dias, R. Repercussões da terapia de reposição hormonal em ratas hipertensas e ou ooforectomizadas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2001; 23: 262-3.

Farris EJ. The rat as an experimental animal. In: *The care and breeding of laboratory animals*. New York: Wiley JS; 1960, p. 1-10.

Fernandes CE. Osteoporose. *Rev Bras Med* 1998; 54: 37-48.

Ferreira JAS. A perimenopausa. *Climatério feminino: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Lemos Editorial; 1999.

Fiat J, Mendonça L. *Métodos de Avaliação da Osteoporose*. Rio de Janeiro [s. n<sup>o</sup>., s. d].

Flieger J, Karachalios LK, Raptou P, Lyritis G. Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 63: 510-4.

Frankel VH, Nordin M. *Biomecânica do osso*. In: Frankel VH, Nordin M. *Biomecânica do sistema musculoesquelético*. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 22-49.

Giavaresi G, Terlizzi E, Gnudi S, Cadossi R, Aldenni N, Fini M, Rocca, M, Giardino R. Discriminant capacity of quantitative ultrasound versus dual X-ray absorptiometry to determine cancellous bone loss in ovariectomized rats. *Bone* 2000; 26: 297-303.

Greenblat RB, Colle ML, Mahesh VB. Ovarian and adrenal steroid production in the postmenopausal woman. *Obstet Gynecol* 1976; 47: 383-7.

Guaguen Y, Bard M. The understanding and recognition of osteoporosis. *Gerontol Biol Chim* 1982; 2: 12.

Guo XE, Goldstein SA. Vertebral trabecular bone microscopic tissue elastic modulus and hardness do not change in ovariectomized rats. *J Orthop Res* 2000; 18: 333-6.

Hamill J, Knutzen K M. Considerações esqueléticas sobre o movimento. In: Hamill J, Knutzen K M. *Bases biomecânicas do movimento humano*. São Paulo: Manole 1999; 40-9.

Hawker GA. The epidemiology of osteoporosis. *J Reumatol Suppl* 1996; 45: 2-5.

Inoue K, Ohguchi H, Yoshikawa T, Okumura M, Sempuku T, Tamai S et al. The effect of aging bone formation in porous hydroxyapatite: biochemical and histological analysis. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 989-94.

Jacob F. Avaliação morfo-funcional do envelhecimento natural do Rato albino com ênfase especial ao aparelho respiratório. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1988.

Jiang Y, Zhão J, Rosen C, Geusens R, Genant H. Perspectives on bone mechanical properties and adaptive response to mechanical challenge. *J Clin Densit* 1999; 2: 423-33.

Johnell O, Guldeberg B, Allander E, Kanis JA, Elffors L, Dequeker J et al. Risk factors for hip fracture in European women. The MEDOS Study. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1802-15.

Kanis JA, McCloskey EV. Evaluation of the risk of hip fracture. *Bone* 1996; 18 Suppl 3:127-32.

Kaplan FS. Prevenção e tratamento da osteoporose. *Rev Clin Symp* 1987; 47: 3-37.

Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM. Form and function of bone, In: Simon SR. ed *Orthopaedic Basic Scienc* 1994; p. 127-84. Rosemont IL: AAOS.

Kaye M, Kusy RP. Genetic lineage, bone mass, and physical activity in mice. *Bone* 1995; 17: 131-5.

Kiel DP, Felson DT, Anderson JJ, Wilson PWF, Moskowitz MA. Hip fracture and the use of estrogens in postmenopausal women: The Framingham study. *N Engl J Med* 1987; 317: 1169-74.

Krane SM, Holick MF. Enfermedad osea metabólica: Osteoporosis. In: Isselbacher K, Braunwald E. *Harson Principios de Medicina Interna* 13<sup>a</sup> ed. Madrid: Interamericana 1994; p. 205.

Laet D, Ha P. Fractures in the elderly: epidemiology and demography. *Clin Endocrinol Metab* 2000; 14: 171-9.

Lane JM, Russel L, Khan SN. Osteoporosis: *Clin Orthop* 2000; 372:139-50.

Liang CT, Barnes J, Seedor JG, Quartuccio HA, Bolander M, Jeffrey, JJ et al. Impaired bone activity in aged rats: alteration at the cellular and molecular levels. *Bone* 1992; 13: 435-41.

Liang H, Pun S, Wronski TJ. Bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1999; 140: 5780-8.

Lindsay R. Prevention and treatment of osteoporosis. *Lancet* 1993; 341: 801-5.

Marques KP, Taveira LA A. Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas. Rev Fob 1998; 6: 9-18.

Marques Neto JF, Lederman R. Osteoporose. Brasil Ano 2000. São Paulo, 1995; 1-131.

Marques Neto JF. Campanha Nacional da Prevenção da Osteoporose. Sociedade Brasileira de Osteoporose. 2001; 13-51.

Müller SS, Curcelli EC, Sardenberg T, Zuccon A, Crudis Jr JL, Padovani CR. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. Acta Ortop Bras 2004; 4:197-204.

Müller SS. Análise comparativa das propriedades mecânicas do ligamento da patela e do tendão calcâneo [Doutorado]. Botucatu, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; 1998.

Myburgh KM, Noakes TD, Rood M, Hough FS. Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. J Appl Physiol 1989; 66: 14-9.

Norman GR, Streiner DL. Bioestatística : the base essentials, 1 ed. Saint Louis: Mosby Book, 1974; p.260.

Novelovitz M. Osteoporose: prevenção, diagnóstico e conduta. Rio de Janeiro. Publicações Científicas; 2001; p. 21.

Obrant KJ, Bengner U, Johnell O, Nilsson BE, Sernbo I. Increasing age - adjusted risk of fragility fractures: a sign of increasing osteoporosis in successive generation: (Editorial). Calcif Tissue Int 1989; 44: 157-67.

Oldenhave A, Jaszmann JB, Haspels AA. Impact of climateric on well being. Am J Obstet Gynecol 1993; 168: 772-80.

Pathas N, Zadik Y, Yaffe P, Schwartz Z, Ornoy A. Oophorectomy-induced osteopenia in rats in relation to age and time post-oophorectomy. *Cells Tissues Organs* 2000; 166: 267-74.

Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen K. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J. Bone Miner* 1994; 9: 1559-65.

Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J. Ovariectomy – induced bone loss can affect by different intensities of treadmill running in rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 441-8.

Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen K, Zhang H. Alteration in the mechanical competence and structural properties in the femoral neck and vertebrae of ovariectomized rats. *J Bone Miner* 1999; 14: 616-23.

Riggs BL, Melton ILJ. Medical progress: involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986; 14:1676.

Riggs BL, Wahner HW, Melton, LJ, Richelson LS, Judd H. L, Fallon WM. Dietary calcium intake and rates of bone loss in women. *J Clin Invest* 1988; 80: 979-82.

Riggs BL, Melton ILJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.

Siffert RS, & Levy RN. Trabecular patterns and the internal architecture of bone. *Mt Sinai J Med* 1979; 48: 221-6.

Sitta MC. Efeitos do treinamento físico com corrida ou levantamento de peso sobre o envelhecimento ósseo de ratos Wistar. [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.

Smith, BA, Livesay GA, Woo SLY. Biology and biomechanics of the anterior cruciate ligament. *Clin Sports Med* 1993; 12: 637-70.

Tabuchi C, Simmons DJ, Fausto A, Russell JE, Binderman I, Avioli LV. Bone deficit in ovariectomized rats : functional contribution of the marrow stromal cell population and the effect of oral dihydrotachysterol treatment. *J Clin Invest* 1986; 637-42.

Thompson DD, Simmons H.A, Pirie CS, Ke HZ. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995; 17 Suppl 4:17:125-33.

Tsuji T, Hughes FJ, McCullogh GAG, Melcher AH. Effect of donor age on osteogenic cells of rats bone in vitro. *Mech Aging Dev* 1990; 51: 121-32.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrinol Rev* 1994; 15: 275–300.

Turner RT. Mechanical signaling in the development of postmenopausal osteoporosis. *Lupus* 1999; 8: 388-92.

Uriu K, Morimoto I, Kai K, Okazaki Y, Okada K. Uncoupling between bone formation and resorption in ovariectomized rats with chronic cadmium exposure. *Toxicol Appl Pharmac* 2000; 164: 264-72.

Vogel, HG. Influence of maturation and aging on mechanical and biomechanical properties of connective tissue in rats. *Mech Ageing Dev* 1980; 14: 283-92.