

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

JULIANA DE CARVALHO APOLINÁRIO COÊLHO

Parâmetros biofísicos, bioquímicos e imunohistoquímicos de
fêmures de *Rattus norvegicus albinus* em diferentes idades
para padronização de valores de referência estática e dinâmica

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do *Campus* de Araçatuba
- Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,
para obtenção do título de “Doutor
em Ciências Fisiológicas”.

Orientador: Prof. Mário Jefferson
Quirino Louzada

Coorientadora: Profa. Maria Tereza
Nunes

Araçatuba

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Juliana de Carvalho Apolinário Coêlho

Parâmetros biofísicos, bioquímicos e imunohistoquímicos de fêmures de
Rattus norvegicus albinus em diferentes idades para padronização de
valores de referência estática e dinâmica

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção
do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino
Louzada.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

Araçatuba

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A643p

Apolinário-Coelho, Juliana de Carvalho.

Parâmetros biofísicos, bioquímicos e imunohistoquímicos de fêmures de *Rattus norvegicus albinus* em diferentes idades para padronização de valores de referência estática e dinâmica / Juliana de Carvalho Apolinário Coelho. - Araçatuba : [s.n.], 2013

75 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

1. Densidade óssea 2. Envelhecimento 3. Osso e ossos
4. Ratos Wistar

CDD 612

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA
(presidente e orientador)

Profa. Dra. KEICO OKINO NONAKA
(membro)

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO
(membro)

Profa. Dra. IVANIA GARAVELO
(membro)

Prof. Dr. JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO
(membro)

Profa. Dra. STELA MÁRCIA MATTIELLO
(suplente)

Profa. Dra. LUCIANA DEL RIO PINOTI CIARLINI
(suplente)

Prof. Dr. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO
(suplente)

Dedicatória

A Deus.

Aos meus pais, Antônio Vito e Rita de Cássia.

Aos meus irmãos, Gisele e Vitor Hugo.

Ao meu cunhado, Oberdan.

As minhas avós, Emerita e Silvia.

Aos meus avôs, Antonio (em memória), Luis (em memória) e Joaquim.

Aos meus amigos.

À minhas tias, Natividade, Maria Marta e Maria Umbelina, Leonildes e Leonice.

A meus padrinhos, José e Maria Helena.

A meus afilhados, Breno e Gabriel.

Ao amigo Edson.

A madrinha Marizete e todos de sua família.

Aos meus sogros, Geovani e Miriam.

A minha cunhada irmã, Natalia e a minha sobrinha Giovanna.

Aos amigos, Léa Ariki e Joji Ariki.

Aos padres, Orides, José Arlindo, Orlando, Edgar, Edson e Roberto.

Ao meu esposo, Willian.

Acreditem, foram vocês quem me fizeram chegar até aqui.

Muito obrigada a todos. Amo vocês!

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de aprender e realizar este curso.

Ao curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, todos os seus idealizadores e responsáveis.

Ao meu orientador, Mário Jefferson Quirino Louzada pelos ensinamentos, amizade e dedicação a mim destinados.

A minha coorientadora Maria Tereza Nunes, a parecerista de meus relatórios Cristina Antoniali Silva e a coordenadora Rita Cássia Menegati Dornelles, pelo tempo e atenção a mim reservados. Ao Pedro Luís Florindo, funcionário técnico do laboratório de Biofísica da FMVA-UNESP, por toda ajuda durante os experimentos e análises, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores e técnicos da FOA e FMVA (UNESP) e da USP - ICB pelos ensinamentos, em especial aos professores e técnicos que permitiram a realização desta pesquisa em seus laboratórios e aos que colaboraram na realização da mesma. Obrigada professores: Edilson Ervolino, Rita Cássia Dornelles, Tereza Cristina Cardoso da Silva, Cristina Maria Monteiro, Ana Cláudia Nakamune, Maria Tereza Nunes, Sérgio Diniz, Luciana Ciarlini, Roberto Gameiro, Roberto Carvalhal, Marcelo Vasconcelos Meireles, Cárís Maroni, Juliana Peiró, Suely Regina Bomfim.

Aos professores das Nucleadoras pelos ensinamentos.

A professora e amiga Kátia Denise Saraiva Bresciani por toda dedicação, amizade, hospedagem e pela oportunidade que me concedeu para participar de diversos projetos de extensão e da publicação de capítulos de livros.

Aos professores Luiz Eduardo Corrêa Fonseca, Wagner André Pedro e Carlos Noriyuki Kaneto pela amizade.

Ao apoio financeiro da CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa. A Pró-Reitoria de pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio financeiro nas viagens para realização das disciplinas.

A todos os funcionários da UNESP (FOA e FMVA) e USP (ICB), em especial: a Valéria, Diogo, Cristiane e Lilian (secretaria de pós-graduação); aos colegas Camilo Venâncio, João Batista e Alan Carvalho (biotério central); a colega Jucilene de Souza; as amigas Fátima, Isabel e Ana Cláudia Manzatti (bibliotecas), Michele (funcionária da xerox - FMVA), Nelci (Neu) e Marta Peres (Martinha); as queridas secretárias Iraci Moraes e Elza Branco; aos amigos Adão Custódio, Alexandre José Teixeira e Luiz Gustavo Lima; e a amiga Leonice Lourenço (USP).

A todos os colegas e alunos do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (FOA-UNESP), do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (FMVA-UNESP), do laboratório de Fisiologia Endócrina: Regulação Hormonal e Expressão Gênica (ICB-USP). Aos colegas das Ciências Fisiológicas que participaram de algumas fases do doutorado mais intensamente, como disciplinas, pesquisas e congressos: Camila Tami, Felipe Munhoz, Simone Potje, Leandro Figueiredo, Monique Patricio, Fabiano Maia, Rita de Cássia Nunes, Aline Yamamoto, Bruna Biffe, Lucilene, Vilma, Gean, Samuel, Wagner, Caril. Aos colegas do Laboratório de Biofísica: Eduardo, Andrea, Priscila Rodrigues, Kelly Vendrame, Luis Gustavo, Orlando, Ronaldo, Bruna Rezende, Marcio, Melise. As amigas Cintia Helena Monteiro Borges e Jamila Cristina Baptistella.

Jesus nos ensina a reconhecer a nossa condição de seres limitados. Não há filho de Deus de primeira categoria e de segunda categoria. Não há viajante, na estrada da vida, de classe executiva ou econômica. Somos todos feitos do mesmo barro, da mesma condição humana, dos mesmos riscos de pecado e das mesmas possibilidades de santidade.

Um líder verdadeiro não usa o poder para proveito próprio, não ostenta o cargo que tem, até porque todos os cargos são passageiros. Nada nos garante a permanência neste reino. Nascermos para a eternidade. O dinheiro não nos poupa da morte, nem os cargos, nem os títulos, nem as condecorações. Evidentemente, podemos nos valer dos bens materiais, podemos evoluir, podemos ocupar cargos de destaque. Temos inteligência para isso. O que não podemos é nos tornar servos desses bens ou dessas glórias. Quem assim age acaba indo ao encontro da própria ruína. Tudo isso é passageiro. E o ser humano tem de buscar em sua vida o que não passa. O que é eterno. O que não se corrompe com o tempo.

(Padre Marcelo Rossi)

APOLINÁRIO-COELHO, J.C. Parâmetros biofísicos, bioquímicos e imunohistoquímicos de fêmures de *Rattus novergicus albinus* em diferentes idades para padronização de valores de referência estática e dinâmica. 2013. 75 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

Resumo

Neste estudo foram avaliadas características ósseas dos fêmures de ratos machos Wistar, em diferentes idades, provendo fundamentação científica para o desenvolvimento de estratégias e mecanismos de prevenção de doenças ósseas. Para tanto, realizou-se a determinação dos parâmetros do fêmur de *Rattus novergicus albinus* com 2, 4, 6, 12, 14, 16 e 20 meses de idade, utilizando densitometria óssea, ensaio mecânico, análises celulares, análise de volume ósseo percentual, espessura trabecular, número de trabéculas e separação trabecular obtidas por microtomografia computadorizada. Os parâmetros ósseos foram apresentados como média e erro padrão da média, submetidos à análise de variância – ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,05$ para comparação entre os grupos. Os resultados indicaram alterações relacionadas com a idade, demonstrando que a força máxima, a rigidez, o material mineral do fêmur, a densidade mineral óssea do colo e cabeça do fêmur, o volume ósseo percentual, a espessura trabecular e a separação entre as trabéculas da cabeça do fêmur apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) aos 12 meses de idade em relação aos animais mais novos e uma diminuição significativa ($p < 0,05$) aos 16 e 20 meses de idade em relação aos animais de 12 meses. Houve menor marcação de TRAP em relação a OC nos animais jovens e adultos (2 e 12 meses de idade). Com base nos achados deste estudo, pode-se concluir que há uma progressão das características ósseas de *Rattus novergicus albinus*, linhagem Wistar, machos, até 12 meses de idade e uma diminuição dos parâmetros ósseos aos 16 e 20 meses de idade.

Palavras-Chave: Densidade óssea. Envelhecimento. Osso e ossos. Ratos Wistar.

APOLINÁRIO-COELHO, J.C. Parameters biophysical, biochemical and immunohistochemical features of femurs from *Rattus norvegicus albinus* at different ages for standardization of reference values static and dynamic. 2013. 75 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

Abstract

We evaluated the femur bone characteristics of male Wistar rats at different ages, providing scientific basis for the development of strategies and mechanisms for the prevention of bone diseases. For that purpose the determination of the parameters of the femur *Rattus norvegicus albinus* with 2, 4, 6, 12, 14, 16 and 20 months of age using bone densitometry, mechanical testing, cellular analysis, analysis of bone volume percentage, trabecular thickness, trabecular number, and trabecular separation obtained by computed microtomography. The bone parameters were presented as mean and standard error of mean, subjected to analysis of variance - ANOVA and Tukey test with $p < 0.05$ for comparison between groups. The results indicate changes related to age, demonstrating that the maximum strength, the stiffness, the mineral material of the femur, the bone mineral density of the femoral lap and head, the bone volume percentage, the trabecular thickness and the separation between the trabecular of the femoral head, showed a significant increase ($p < 0,05$) at 12 months of age compared to younger animals and a significant decrease ($p < 0,05$) at 16 and 20 months of age compared to animals 12 months. There was a lower mark of TRAP in relation to OC in young and adult animals (2 and 12 months of age). Based on our findings, we can conclude that there is a progression of bone characteristics in *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage, males, until 12 months of age and a decrease in bone parameters between 16 and 20 months of age.

Keywords: Bone density. Aging. Bone and bones. Wistar rats.

Lista de Figuras

<i>Figura 1 -</i>	Densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA) - modelo DPX-Alpha, Lunar®.	23
<i>Figura 2 -</i>	Radiografia dos fêmures junto à escada de alumínio para posterior análise de comprimento e diâmetro ósseo.	24
<i>Figura 3 -</i>	Máquina universal EMIC®, modelo DL 3000.	25
<i>Figura 4 -</i>	Microtomografia óssea. Região de interesse da imagem obtida na microtomografia óssea manualmente interpolada do osso trabecular.	26
<i>Figura 5 -</i>	Variação da massa corpórea (g) de ratos Wistar relacionada à idade.	30
<i>Figura 6 -</i>	Correlação entre a massa corpórea (g) e a idade (meses) de ratos Wistar.	31
<i>Figura 7 -</i>	Variação do comprimento (cm) de ratos Wistar relacionada à idade.	32
<i>Figura 8 -</i>	Variação da circunferência torácica (cm) de ratos Wistar relacionada à idade.	32
<i>Figura 9 -</i>	Variação da circunferência abdominal (cm) de ratos Wistar relacionada à idade.	33
<i>Figura 10 -</i>	Variação do nível de fósforo plasmático (mg/dL) de ratos Wistar relacionada à idade.	34
<i>Figura 11 -</i>	Variação do nível de cálcio plasmático (mg/dL) de ratos Wistar relacionada à idade.	34
<i>Figura 12 -</i>	Variação do nível de fosfatase alcalina (U/L) de ratos Wistar relacionada à idade.	35
<i>Figura 13 -</i>	Efeito da idade no comprimento do fêmur em ratos Wistar.	36
<i>Figura 14 -</i>	Correlação entre o comprimento do fêmur (mm) e a massa corpórea (g) de ratos Wistar.	36
<i>Figura 15 -</i>	Correlação entre o comprimento do fêmur (mm) e o comprimento (cm) de ratos Wistar.	37
<i>Figura 16 -</i>	Efeito da idade no diâmetro do fêmur em ratos Wistar.	37
<i>Figura 17 -</i>	Efeito da idade na Força Máxima admitida pela cabeça do fêmur em ratos Wistar.	38
<i>Figura 18 -</i>	Efeito da idade na Força Máxima admitida pelo terço médio do fêmur em ratos Wistar.	39
<i>Figura 19 -</i>	Efeito da idade na rigidez da região proximal do fêmur (cabeça e colo)	40

em ratos Wistar.

<i>Figura 20 -</i>	Efeito da idade na rigidez do terço médio do fêmur em ratos Wistar.	40
<i>Figura 21 -</i>	Efeito da idade na área óssea do fêmur em ratos Wistar.	41
<i>Figura 22 -</i>	Efeito da idade no conteúdo mineral ósseo do fêmur em ratos Wistar.	42
<i>Figura 23 -</i>	Efeito da idade na densidade mineral óssea do fêmur em ratos Wistar.	42
<i>Figura 24 -</i>	Efeito da idade na densidade mineral óssea da região da cabeça e colo do fêmur em ratos Wistar.	43
<i>Figura 25 -</i>	Correlação entre densidade mineral óssea do fêmur (g/cm^2) e massa corpórea (g) de ratos Wistar.	43
<i>Figura 26 -</i>	Correlação entre densidade mineral óssea do fêmur (g/cm^2) e a idade (meses) de ratos Wistar.	44
<i>Figura 27 -</i>	Efeito da idade na massa do fêmur em ratos Wistar.	45
<i>Figura 28 -</i>	Efeito da idade na quantidade de material mineral do fêmur em ratos Wistar.	45
<i>Figura 29 -</i>	Imagens ósseas, em 3D, da região trabecular da cabeça do fêmur de ratos Wistar de diferentes idades.	46
<i>Figura 30 -</i>	Aspecto histológico da epífise, cartilagem epifisária e diáfise de ratos com 2 meses (G-2m).	50
<i>Figura 31 -</i>	Aspecto histológico da epífise, linha epifisária e diáfise de ratos com 12 meses (G-12m).	51
<i>Figura 32 -</i>	Aspecto histológico da epífise, linha epifisária e diáfise de ratos com 16 meses (G-16m).	52
<i>Figura 33 -</i>	Imunomarcção de OC e TRAP em G-2, G-12m e G-16m.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Volume ósseo percentual – BV/TV, espessura trabecular – Tb.Th, 47
número de trabéculas – Tb.N e separação entre trabéculas – Tb.Sp dos
fêmures dos ratos nos diferentes idade, obtidos pela microtomografia
computadorizada.

Lista de Abreviaturas

- 3D: três dimensões
- BV/TV: volume ósseo percentual
- CMO: conteúdo mineral ósseo
- D: diâmetro
- DMO: densidade mineral óssea
- DR: densidade radiográfica
- DXA: densitômetro de dupla emissão de raios-X
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- Fmax: força máxima
- G-12m: grupo de 12 meses
- G-14m: grupo de 14 meses
- G-16m: grupo de 16 meses
- G-20m: grupo de 20 meses
- G-2m: grupo de 2 meses
- G-4m: grupo de 4 meses
- G-6m: grupo de 6 meses
- HE: hematoxilina/eosina
- L: comprimento
- LOU: louvain
- M-CSF : fator estimulante da colônia de monócito
- MM: material mineral
- OC: osteocalcina
- RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB
- SD: sprague-dawley
- Tb.N: número de trabéculas por micrômetro de tecido
- Tb.Sp: separação trabecular
- Tb.Th: espessura trabecular
- TGF- β : fator de crescimento transformador beta
- TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

Sumário

1 Introdução	16
2 Objetivo	20
3 Material e Método	21
3.1 Animais	21
3.2 Massa Corpórea	21
3.3 Biometria	22
3.4 Dosagens bioquímicas	22
3.4.1 Cálcio	22
3.4.2 Fósforo	22
3.4.3 Fosfatase alcalina	22
3.5 Densidade mineral óssea	22
3.6 Comprimento e diâmetro	23
3.7 Força máxima e rigidez	24
3.7.1 Flexão à três pontos	25
3.7.2 Compressão axial	25
3.8 Massa do fêmur e quantidade de material mineral ósseo (cinzas)	25
3.9 Porosidade cortical e conectividade trabecular	26
3.10 Análise histológica	26
3.11 Técnica Imunohistoquímica para detecção de OC E TRAP	28
3.11.1 Análise histológica das amostras submetidas a imunoperoxidase	28
3.12 Análise Estatística	29
4 Resultados	30
4.1 Massa Corpórea (g)	30
4.2 Biometria	31
4.3 Parâmetros Bioquímicos	33
4.4 Comprimento e Diâmetro Ósseo (mm)	35
4.5 Força Máxima (N) – Compressão Axial e Flexão em três pontos	38
4.6 Rigidez (N/mm) – cabeça do fêmur e terço médio do fêmur.	39
4.7 Área Óssea, Conteúdo Mineral Ósseo e Densidade Mineral Óssea.	41
4.8 Massa dos fêmures e Quantidade de Material Mineral (cinzas).	44
4.9 Porosidade Cortical e Conectividade Trabecular.	46

4.10 Análise histológica qualitativa	48
4.11 Imunomarcção para Osteocalcina e TRAP	53
5 Discussão	55
6 Conclusões	62
Referências	63
Anexo	74

1 Introdução

Em 1865, o pesquisador Claude Bernard lançou os primeiros princípios do uso de animais de experimentação na medicina humana, baseado na comparação dos parâmetros fisiológicos interespecies (BERNARD, 1865). A partir de então, os modelos não humanos vêm sendo utilizados em larga escala em todos os campos da pesquisa (RUSSEL, 2001; VIEIRA; HOSSNE 1998;).

O *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, é um roedor da família Muridae, utilizado e aceito como modelo experimental em pesquisas (FAGUNDES; TAHA, 2004; HOF; RLATG, 2000), ao qual se devem grandes avanços na medicina humana e animal (DANTAS et al., 2006; LILLIE et al., 1996; MEDEIROS et al., 2006; PINHEIRO et al., 1997/1998; SOUZA; SILVA FILHO, 1999; VOLPON et al., 2008). Desta forma, o perfil anatomofisiológico destes organismos que servem como base na experimentação animal deve ser conhecido (PRINTZ, 2004; SHARP; La REGINA, 1998).

Diversos pesquisadores apresentam análises de diferentes parâmetros para o *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, como longevidade, frequência cardiorrespiratória, temperatura retal, dados bioquímicos, hematológicos e imunológicos em resposta a alterações iatrogênicas, dentre outros (HARKNESS; WAGNER, 1993; MESSIAS et al., 2009; ROGATTO; LUCIANO, 2000, 2002; SANTOS et al., 2004; TEIXEIRA et al. 2000;). Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliam esses mesmos parâmetros em condições fisiológicas (DANTAS et al., 2006; MESSIAS et al., 2009; PINHEIRO et al., 1997/1998).

Na literatura científica há escassez de avaliações para parâmetros ósseos, com a apresentação de indicadores biológicos/biofísicos ao longo do desenvolvimento, além da discrepância observada nos resultados quanto ao efeito do avanço da idade da constituição óssea (BOYCE et al., 1999; MANOLAGAS et al., 1995;).

Em estudos biomecânicos é imprescindível que se conheçam as variações das características ósseas com o decorrer da idade (BRANDÃO; VIEIRA 1999; CAMPOS et al., 2003; CASSIDY, 1999; COSTA-PAIVA, 2003; GALLI, 2001), como o comportamento mecânico, densidade mineral óssea, força máxima e rigidez, uma vez que, em diversos estudos, ocorrem divergências quanto à classificação destas variáveis ósseas em função da utilização de ratos de várias faixas etárias (AGUILAR

et al., 2007; PESSAN et al., 1996; QUINTON, 2005), sendo necessário determinar as características de comprimento, diâmetro ósseo e massa corpórea, para que se possa estabelecer a idade real destes animais.

As características do tecido ósseo devem ser avaliadas levando-se em consideração as variáveis raça, peso, comprimento e idade, com especial atenção ao estágio de desenvolvimento sexual, podendo-se notar diferenças significativas na constituição do esqueleto axial e apendicular (GILSANZ et al., 1998).

O osso é um tecido vivo, metabolicamente ativo, em equilíbrio dinâmico, que promove a regulação da mobilização e deposição mineral permanente. Este fenômeno ocorre principalmente em resposta às forças mecânicas impostas, níveis hormonais e ao envelhecimento (DOMINGUEZ et al., 2011), com a atuação de células especializadas denominadas osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células de revestimento, que promovem a remodelação óssea (DATTA et al., 2008; MARTIN, 2007).

A remodelação óssea exige a ação coordenada das células ósseas dentro da unidade básica multicelular, também conhecida como compartimento de remodelação óssea (HAUGE et al., 2001; PARFITT, 2001; SEEMAN, 2009). Inicialmente, as células de revestimento ósseo degradam os osteóides desmineralizados e aumentam a expressão de fatores de crescimento, promovendo o recrutamento das células precursoras de osteoclastos para o osso (KOBAYASHI; KRONENBERG, 2005).

Estas células se diferenciam em osteoclastos em resposta a elevadas concentrações de M-CSF (fator estimulante da colônia de macrófagos) e RANKL (receptor ativador do fator nuclear κ B ligante) (FENG; Mc DONALD, 2011). Os osteoclastos se ligam a superfície óssea pela via de ligação integrina $\alpha\beta 3$ e vitronectina. Estas células secretam enzimas ácidas e hidrolíticas para digerir a matriz óssea, resultando na degradação dos componentes minerais, orgânicos e na liberação de fragmentos minerais ósseos e colagenosos, fenômeno denominado reabsorção óssea (DATTA et al., 2008; PARFITT, 1994).

Após a reabsorção óssea, os osteoclastos sofrem apoptose, possivelmente induzida pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β), responsável também pela atração dos osteoblastos (MUNDY, 1991; TANG et al., 2009). Esta atração osteoblástica ocorre após as células mononucleadas da linhagem de macrófagos e monócitos preparar a superfície óssea para a adesão dos osteoblastos. Inicia-se

então uma cascata de eventos que envolvem a proliferação de células tronco mesenquimais e osteoprogenitoras em pré-osteoblastos, que darão origem aos osteoblastos maduros. Estes osteoblastos maduros sintetizam colágeno e outras proteínas da matriz, preenchendo a cavidade de reabsorção com osteóide lamelar novo e deposição mineral, resultando em um novo osso (AMADEI et al., 2006; FENG; Mc DONALD, 2011).

Entretanto, a quantidade, qualidade e a constituição do tecido ósseo tende ao declínio com o avanço da idade, ocorrendo deterioração da microarquitetura óssea, com conseqüente enfraquecimento deste tecido, predispondo ao surgimento de osteoporose e fraturas (CARVALHO, 2006; DEQUEKER et al., 1997; PEDRINELLI et al., 2009; QUINTON, 2005; SILVA, 2003; TURNER, 2007).

O envelhecimento populacional que se desenvolve de forma clara e irreversível é um fenômeno mundial, que não se limita a um determinado estado socioeconômico da população (CREALEY et al., 2003; RICCI et al., 2005). Este evento delinea um conjunto de desafios para as sociedades, destacando-se a garantia da saúde e qualidade de vida dos idosos (FARIA et al., 2010), uma vez que, as alterações das características ósseas relacionada com a idade é a causa fundamental de fraturas em pessoas idosas (RAISZ, 2005).

A diminuição da massa óssea advinda com o envelhecimento ocorre em todo o corpo, sendo, todavia mais acentuada no osso fêmur, provavelmente devido à diminuição das atividades diárias (MAYHEW et al., 2005; TURNER, 2005; YOSHIKAWA et al., 1994b).

A análise de parâmetros ósseos relacionados à idade foi objeto de alguns estudos com ratos F344, ratos albinos Louvain (LOU) e ratos Sprague-Dawley (SD) (BANU et al., 2002; DUQUE et al., 2009; PIETSCHMANN et al., 2007). No entanto, não foram encontrados trabalhos que relacionem os parâmetros biofísicos ósseos com o avançar da idade, crescimento e envelhecimento em *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar.

Portanto, por ser facilmente controlados estudos com ratos em comparação à estudos com humanos, proporcionando resultados rápidos, devido a curta duração de vida dos animais e fácil acesso ao esqueleto e por ser o rato Wistar utilizado amplamente em projetos de pesquisa, a determinação de parâmetros ósseos destes animais durante seu desenvolvimento normal e natural é de fundamental importância. Tendo como hipótese que o envelhecimento altera as propriedades

ósseas em ratos Wistar. Assim é objetivo deste trabalho realizar um estudo longitudinal para que se possa avaliar as alterações dos parâmetros ósseos com o avanço da idade.

2 Objetivo

É objetivo deste trabalho realizar um estudo longitudinal para que se possa avaliar as alterações dos parâmetros ósseos com o avanço da idade em ratos Wistar, por meio da determinação dos níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina, da massa corpórea, circunferência torácica, abdominal e comprimento do animal, do comprimento, diâmetro, densidade mineral óssea, resistência óssea (força máxima admitida e rigidez), quantidade de material mineral (cinzas), volume ósseo percentual, espessura trabecular, número de trabéculas por micrômetro de tecido e separação trabecular, por análise histológica e detecção de osteocalcina e TRAP por imunohistoquímica de fêmures de ratos da raça *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar até os 20 meses, com avaliações periódicas aos 2, 4, 6, 12, 14, 16 e 20 meses de idade.

3 Material e Método

3.1 Animais

Este experimento está de acordo com os princípios éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP) em 12/02/2009 de acordo com o protocolo 2008-001232. Foram estudados 70 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / campus de Araçatuba - SP.

Os animais foram mantidos em gabinete com ambiente controlado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade de 65%, ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), com filtragem de ar, em gaiolas comuns com número de cinco em cada uma, sendo alimentados com ração Purina- Labina[®] (Magnésio – 0,006 mg, Ferro – 180 mg, Cobre – 30 mg, Zinco – 110 mg, Manganês – 110 mg, Iodo – 1 mg, Selênio – 0,2 mg, Cobalto – 2 mg, Vitamina A – 25.577 UI, Vitamina D3 – 4.000 UI, Vitamina E – 82 mg, Vitamina K – 6,40 mg, Ácido Fólico – 13 mg, Biotina – 0,16 mg, Colina – 2.800 mg, Niacina – 220 mg, Pantotenato de cálcio – 90 mg, Tiamina – 11 mg, Riboflavina – 12 mg, Piridoxina – vit. B6 HCl – 11 mg, Antioxidante – 200 mg, Ácido propiônico 1.486 mg, Umidade máxima – 13%, Proteína bruta (min.) – 23%, Extrato etéreo (min.) – 4%, Matéria fibrosa (max.) – 7%, Matéria mineral (max.) – 10%, Cálcio (máx.) – 1,30%, Fósforo (min.) – 0,85%) e água potável à vontade. Os animais foram separados aleatoriamente em 7 grupos experimentais de 10 animais cada, sendo os grupos de 2, 4, 6, 12, 14, 16 e 20 meses de idade, que foram identificados como G-2m, G-4m, G-6m, G-12m, G-14m, G-16m e G-20m. A anestesia foi realizada com a administração de Ketamina (30 mg/kg) e Xilazina (3 mg/kg) via intramuscular, obtendo-se anestesia do animal com ausência total dos reflexos. O sangue foi obtido por meio de punção intracardíaca e, em seguida, foi realizada a eutanásia por decapitação com posterior retirada dos fêmures.

3.2 Massa Corpórea

A massa corpórea foi avaliada quando os animais tinham 2 meses de idade e no momento da eutanásia dos mesmos, utilizando balança digital de precisão (Balança Toledo[®]).

3.3 Biometria

A biometria foi realizada no dia da eutanásia dos animais, usando fita métrica para mensuração da circunferência torácica, abdominal e comprimento do animal. O comprimento do animal foi mensurado entre o nariz e o ânus.

3.4 Dosagens bioquímicas

Após a coleta em tubos heparinizados (vacutainer), o sangue foi centrifugado a 2566G, durante 15 minutos a 4^oC. O plasma foi utilizado para a realização das dosagens para determinação das concentrações de cálcio, fósforo, e fosfatase alcalina.

3.4.1 Cálcio

As determinações de cálcio foram realizadas pela espectrofotometria (Kit marca Labtest cat. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm.

3.4.2 Fósforo

As determinações de fósforo foram realizadas por meio do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972) modificado, utilizando kits comerciais, marca Labtest (Cat. 12). O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de complexo fosfomolibdato não reduzido, que foi determinado em 340 nm.

3.4.3 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina foi determinada por método de Roy (1970) modificado, com o emprego de Kits da marca Labtest (Cat. 40), por reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato.

3.5 Densidade mineral óssea

Após a eutanásia, os membros pélvicos foram dissecados e os fêmures desarticulados, removidos e limpos dos tecidos moles circundantes. Os fêmures

direitos de cada animal foram submetidos à análise da densidade mineral óssea – DMO (em g/cm^2), área (cm^2) e conteúdo mineral ósseo – CMO (g) medidos em todo o osso. Igualmente, a DMO foi medida na região proximal do fêmur (colo e cabeça) com o densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA) previamente calibrado conforme fabricante (modelo DPX-Alpha, Lunar[®]) com software especial para pequenos animais (pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP – Figura 1). Para tal, os ossos limpos foram colocados em um recipiente de acrílico com água deionizada e escaneados usando o densitômetro com software para pequenos animais, acoplado a um computador, selecionando-se a região de interesse com posterior análise densitométrica.

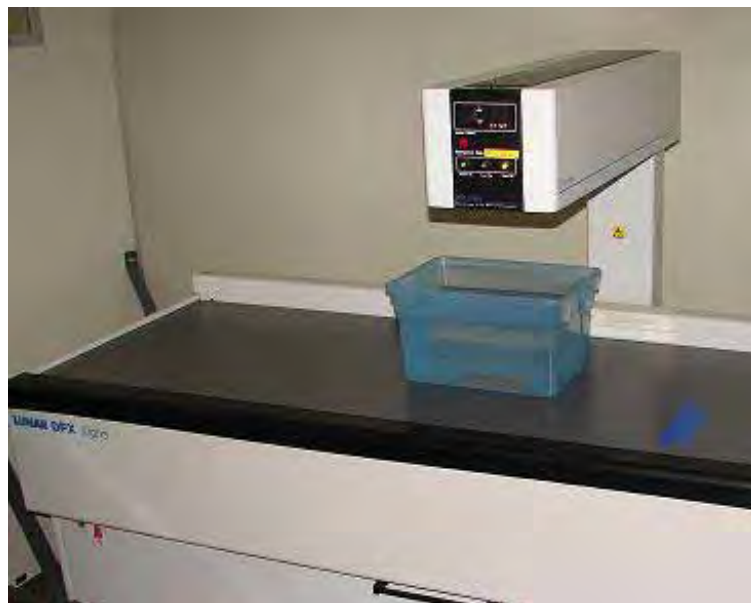


Figura 1 Densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA) - modelo DPX-Alpha, Lunar[®].

3.6 Comprimento e diâmetro

Os ossos foram radiografados, junto a uma escada de alumínio (liga 6063, ABNT) de nove degraus tendo cada degrau $5 \times 25 \text{mm}^2$ de área (Figura 2), com técnica de rotina. As radiografias foram digitalizadas com resolução 200 DPI, em scanner HP Scanjet G4050 e então as imagens digitalizadas foram armazenadas em extensão TIFF. Estas imagens digitalizadas foram usadas para análise do comprimento (L) e do diâmetro (D) do fêmur pela densidade radiográfica – DR (LOUZADA, 2009) com o programa computacional Image J[®] versão 1.43u (domínio público – <http://rbs.info.nih.gov/ij>). O programa computacional Image J[®] foi utilizado

para avaliar o nível de cinza (em tons de cinza) das imagens radiográficas dos fêmures e dos degraus da escada de alumínio de 9 degraus, utilizada como referencial densitométrico. O diâmetro foi mensurado no meio geométrico do osso.

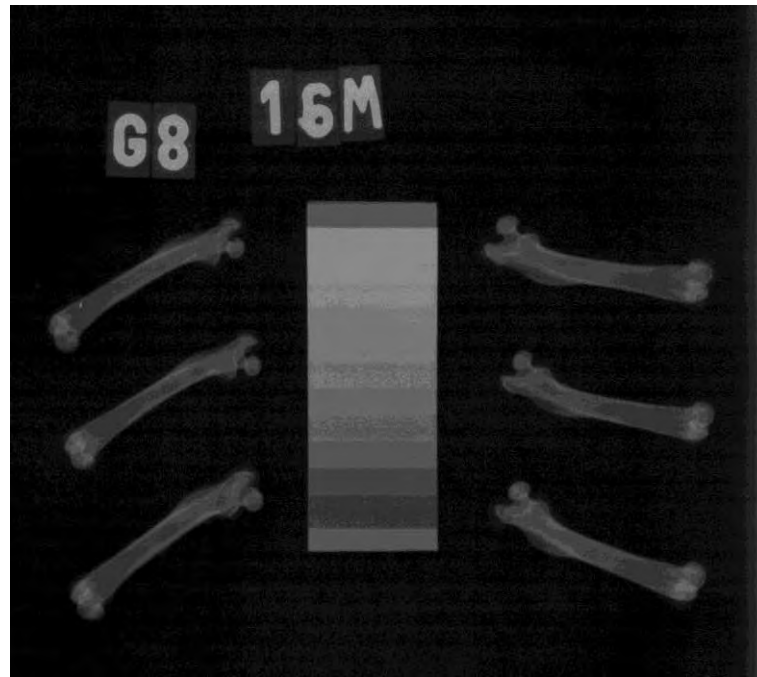


Figura 2 Radiografia dos fêmures junto à escada de alumínio para posterior análise de comprimento e diâmetro ósseo.

3.7 Força máxima e rigidez

Os fêmures foram submetidos a ensaios mecânicos (flexão a três pontos e compressão axial) em máquina universal EMIC[®], modelo DL 3000 (pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da FOA/UNESP-Araçatuba) (Figura 3). A carga foi aplicada a velocidade de 5mm/min e aplicação da força de 2000N para determinação da força máxima admitida (F_{max}) pelo osso e determinação posterior da rigidez óssea. Estas variáveis expressam a resistência óssea no colo do fêmur e no terço médio do fêmur. Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento que fornece os valores de Força x Deformação. Para o cálculo da rigidez determina-se a parte da curva de Força Máxima (N) x Deformação (mm) relativa à fase elástica do corpo (parte reta da curva). Estes dados foram levados a planilha Excel e determinado a equação linear (1^o grau, $y = a.x+b$) que melhor ajustava aos pontos. Nesta equação, a inclinação da curva é dada pela

constante \underline{a} , que multiplica a variável \underline{x} e expressa a rigidez do osso (inclinação da curva na fase elástica).



Figura 3 Máquina universal EMIC[®], modelo DL 3000.

3.7.1 Flexão a três pontos

Os ossos foram apoiados em dois suportes (dois pontos), sendo a distância de vão de apoio de $\frac{3}{4}$ do comprimento do osso. A força foi aplicada no osso em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (terço médio do osso). O ensaio é destrutivo e registra a força máxima admitida.

3.7.2 Compressão axial

Para análise da Fmax e Rigidez na região de colo femoral, o fêmur foi colocado em aparato de metal, mantido fixado na vertical (longo eixo) por 6 parafusos distribuídos em duas linhas transversais: uma mais proximal e outra na porção distal, com 3 parafusos cada, formando ângulo de 120° entre si. A carga foi aplicada na região da cabeça do fêmur cuja linha de ação do vetor força é paralela ao eixo longo do fêmur, causando uma flexão e um momento fletor na região da cabeça e colo femoral (PAJAMÄKI et al., 2008).

3.8 Massa do fêmur e quantidade de material mineral ósseo (cinzas)

Após as análises, a massa dos fêmures foram mensuradas com balança de precisão e submetidos à determinação da quantidade de material mineral (cinzas) –

MM. Inicialmente os ossos foram colocados em mufla a 600°C, durante 6 horas, para a obtenção das cinzas por calcinação. Após resfriamento em dessecador, as massas das cinzas foram obtidas utilizando-se balança de precisão (0,0001g). Esta análise foi realizada no laboratório de Bromatologia do curso de Medicina Veterinária/UNESP/Campus de Araçatuba-SP.

3.9 Porosidade cortical e conectividade trabecular

A extremidade proximal dos fêmures dos animais foi escaneada usando microtomógrafo computadorizado Skyscan 1172 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea. A microtomografia óssea foi realizada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. A região de interesse de osso foi manualmente interpolada e 50 slices (fatias) na região de cabeça do fêmur foram analisadas com resolução de 12x12x12 μm (Figura 4). Os parâmetros analisados foram: BV/TV (%) - volume ósseo percentual (volume ósseo pelo volume tecidual); Tb.Th (μm) - espessura trabecular; Tb.N ($1/\mu\text{m}$) - número de trabéculas por micrômetro de tecido, e Tb.Sp (μm) - separação trabecular. A figura abaixo representa a região analisada na microtomografia óssea.

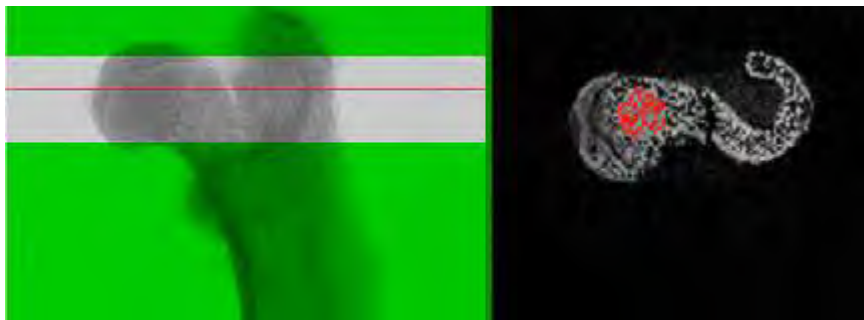


Figura 4 Microtomografia óssea. Região de interesse da imagem obtida na microtomografia óssea manualmente interpolada do osso trabecular.

3.10 Análise histológica

Os fêmures de cinco animais dos grupos de 2, 12 e 16 meses foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado por 24 horas. Depois da fixação, os fêmures foram descalcificados por EDTA (Sal Dissódico) P.A-ACS - Dinâmica[®] a 10% em temperatura ambiente por 45 dias, até atingir o ponto de corte (o ponto de corte foi testado com um alfinete, o mesmo deveria perfurar o osso de maneira fácil, sem

impor resistência, o teste foi feito na região do osso que não iria ser analisada), o EDTA era trocado a cada 7 dias.

Após a descalcificação, os fêmures foram lavados exaustivamente em água corrente por 12 horas para remoção dos resíduos de EDTA e depois inclusos em parafina. Antes da inclusão em parafina os ossos foram cortados em três partes iguais, sendo região proximal, medial e distal do fêmur. O processamento para inclusão de material em parafina passou por três etapas: desidratação, clarificação e impregnação (infiltração). A desidratação foi realizada com álcool etílico - Synth[®]. A clarificação visa remover completamente o álcool do interior dos tecidos, pois a parafina de baixa fusão - Erviegas[®] não se mistura homoganeamente com o álcool. Para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina utilizou-se o xilol - Synth[®].

Pela microtomia foram realizados cortes seriados na região proximal do fêmur (um terço proximal) dos animais G-2m, G-12m e G-16m com espessura de 6 µm que foram estendidos em lâminas silanizadas - Starfrost[®] para realização da coloração e posterior realização da reações imunohistoquímicas.

Após a microtomia, uma lâmina de cada animal, com um corte por lâmina, dos grupos G-2m, G-12m e G-16m foram coradas pela técnica de Hematoxilina/Eosina (HE) para posterior análise morfológica.

O procedimento para a coloração foi a desparafinização para retirada da parafina dos cortes após a microtomia, utilizando xilol; a hidratação, que foi realizada por meio de sequências alcoólicas em concentrações decrescentes, ou seja, álcool 100%, 95%, 80%, 70%, até a água destilada; a coloração, realizada pela imersão dos cortes no corante, favorecendo a combinação de suas estruturas com o corante para posterior visualização em microscópio de luz; a desidratação utilizando concentrações alcoólicas crescentes (álcool 70%, 80%, 95% e 100%); a clarificação, utilizando xilol como líquido intermediário entre o álcool e o meio de selagem e a selagem, ou montagem da lâmina propriamente dita, onde se cobriu o tecido com uma lamínula de vidro, usando uma substância para fixar a lâmina à lamínula (selagem).

3.11 Técnica Imunohistoquímica para detecção de OC E TRAP

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão *Diva Decloaker*[®] (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada *Decloaking Chamber*[®] (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Lâminas histológicas contendo amostras dos grupos experimentais de 2, 12 e 16 meses foram divididas em dois lotes, e cada lote foi submetido à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OC do rato gerado em cabra (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-TRAP do rato gerado em coelho (1:180; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subseqüentes empregou-se o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit[®] (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracorados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

3.11.1 Análise histológica das amostras submetidas à imunoperoxidase

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. A imunomarcção foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citossólico das células. Em cada animal foram analisados, com um aumento de

250x, seis campos microscópicos, cada qual com uma área de 1200 μ m x 1600 μ m, situados na epífise (dois), metáfise (um) e diáfise (três). Para ambos marcadores foi efetuada uma análise semi-quantitativa. Foram utilizadas duas secções histológicas de cada animal e o critério para o estabelecimento da imunomarcação foi modificado de Faria *et al.* (2008). Para a OC: (3) alto padrão de imunomarcação (\cong 3/4 das células imunorreativas (IR) por campo microscópico), (2) moderado padrão de imunomarcação (\cong 1/2 das células-IR por campo microscópico), (1) baixo padrão de imunomarcação (\cong 1/4 das células-IR por campo microscópico) e (0) padrão de imunomarcação nulo (ausência total de células-IR por campo microscópico). Para TRAP: (3) alto padrão de imunomarcação (em média mais de 6 células imunorreativas (IR) por campo microscópico), (2) moderado padrão de imunomarcação (em média entre 3 e 5 células-IR por campo microscópico), (1) baixo padrão de imunomarcação (em média menos de 3 células-IR por campo microscópico) e (0) padrão de imunomarcação nulo (ausência total de células-IR por campo microscópico). Foram quantificados apenas os osteoclastos que se mostravam TRAP-positivos, com três ou mais núcleos e acoplados à matriz óssea ou junto de lacunas de reabsorção.

3.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos estão apresentados como média e erro padrão da média. Foi realizada análise de variância – ANOVA- one way e teste de Tukey, para determinar diferença estatística entre os grupos de 2, 4, 6, 12, 14, 16 e 20 meses. Para valores de $p < 0,05$, a diferença entre os grupos foi considerada significativa. Foram traçadas curva de correlação entre algumas variáveis para ver o grau de dependência entre elas. As análises histológicas foram avaliadas qualitativamente.

4 Resultados

A comparação das variáveis analisadas entre os grupos está apresentada nos gráficos abaixo.

4.1 Massa Corpórea (g)

Os animais apresentaram um aumento gradual da massa corpórea com a idade, com auge aos 16 meses, decrescendo consideravelmente naqueles animais com 20 meses (Fig. 5). Os valores para massa corpórea demonstraram ser justificados em 84% pela mudança na idade (Fig. 6).

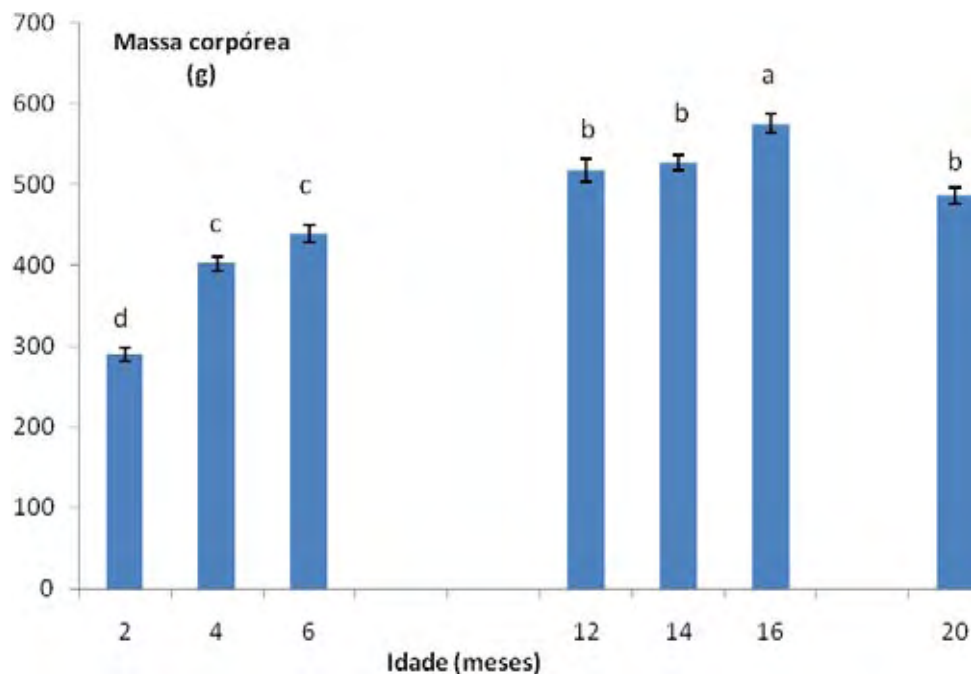


Figura 5 Massa corpórea (g) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

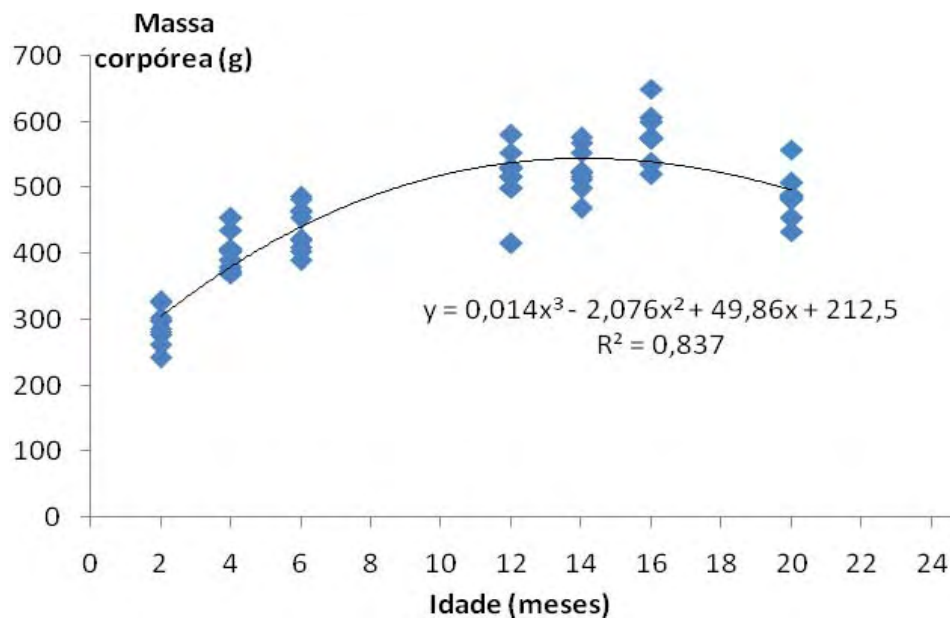


Figura 6 Correlação entre a massa corpórea (g) e a idade (meses) de ratos Wistar. O $R^2 = 0,837$ indica que a massa corpórea é explicada em 84% pela variação da idade.

4.2 Biometria

A análise estatística demonstrou um aumento gradual do comprimento dos animais até os 12 meses de idade, manutenção aos 14 meses em relação aos 12 meses e diminuição aos 16 meses mantendo se aos 20 meses de idade (Figura 7). Para circunferência torácica obteve-se aumento aos 4 meses de idade em relação aos 2 meses, uma manutenção aos 6 meses em relação aos 4 meses, um pico aos 12 meses e novamente uma diminuição aos 20 meses de idade (Figura 8). Houve aumento da circunferência abdominal até os 16 meses de idade e diminuição aos 20 meses (Figura 9).

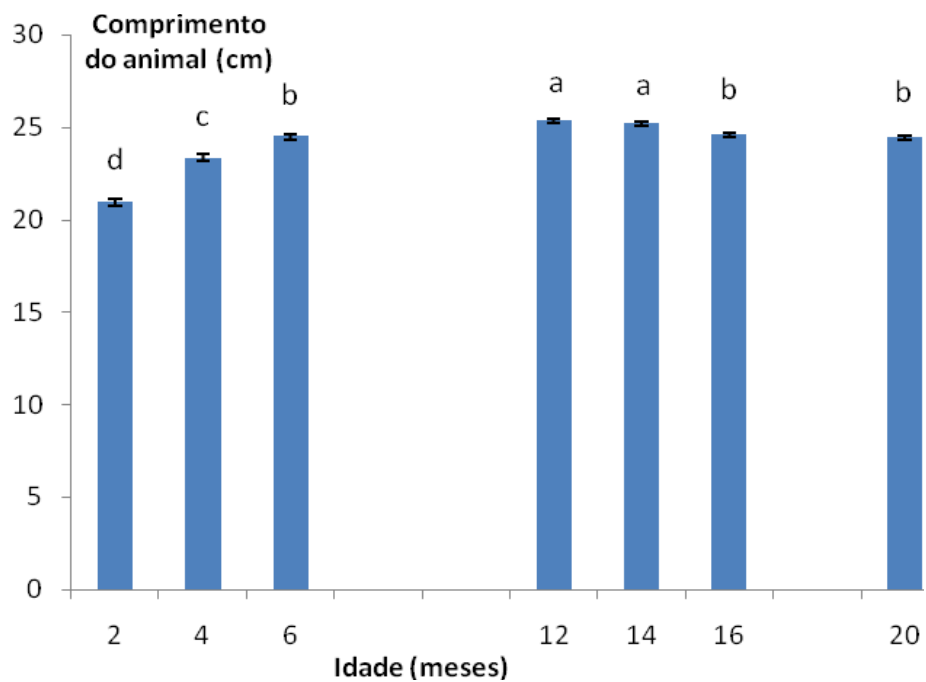


Figura 7 Comprimento (cm) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

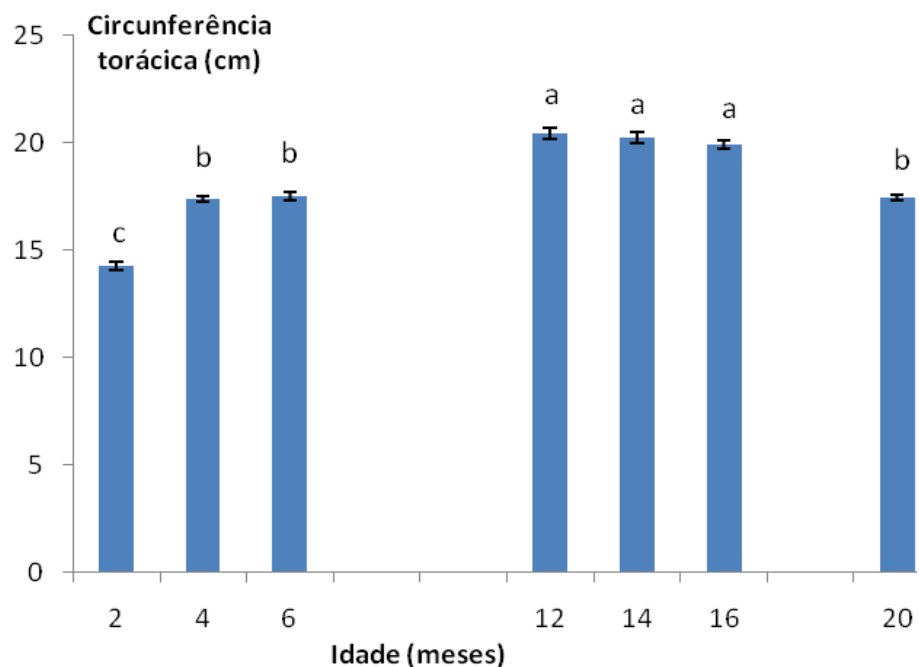


Figura 8 Circunferência torácica (cm) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

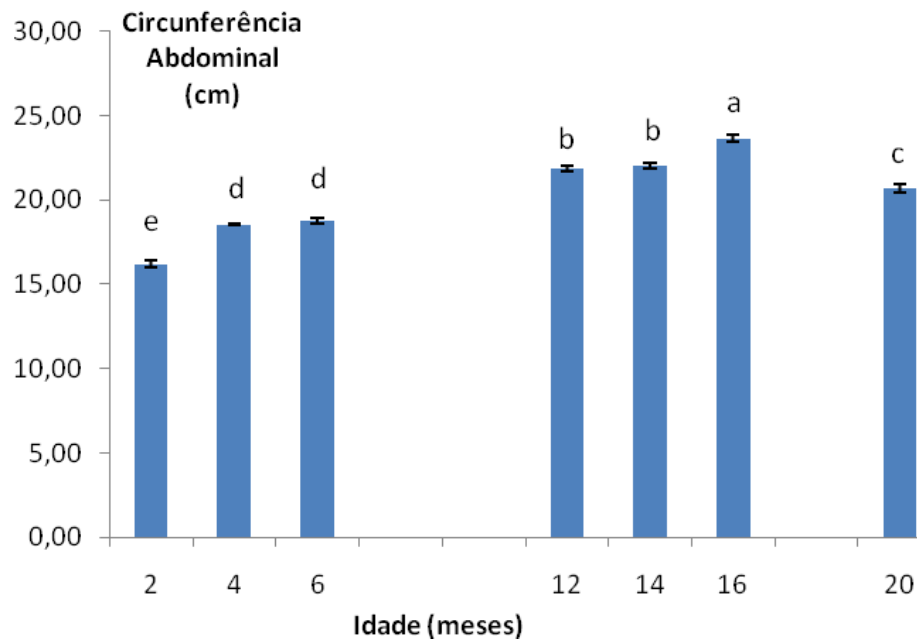


Figura 9 Circunferência abdominal (cm) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.3 Parâmetros Bioquímicos

Os níveis plasmáticos de fósforo (fosfato orgânico) apresentou aumento nos animais de 6 meses de idade em relação aos de 2 meses, e manutenção nos animais de 12, 14 e 16 meses. Quando comparado os animais de 20 meses frente aos de 12 meses houve uma diminuição da concentração de fósforo (Figura 10).

Não houve diferença da concentração plasmática de cálcio livre entre os grupos, com exceção do grupo de 12 meses que apresentou elevado nível de cálcio em relação aos demais grupos (Figura 11).

Com referência à fosfatase alcalina plasmática, nota-se uma redução da fosfatase alcalina até os 6 meses de idade em relação ao grupo de 2 meses, elevando-se aos 12 meses, com posterior manutenção (Figura 12).

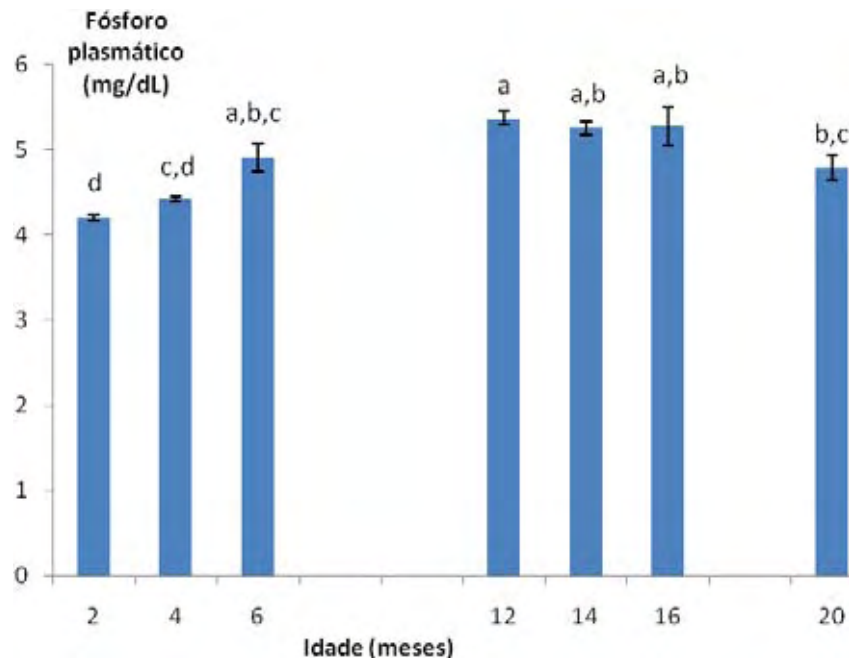


Figura 10 Nível de fósforo plasmático (mg/dL) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

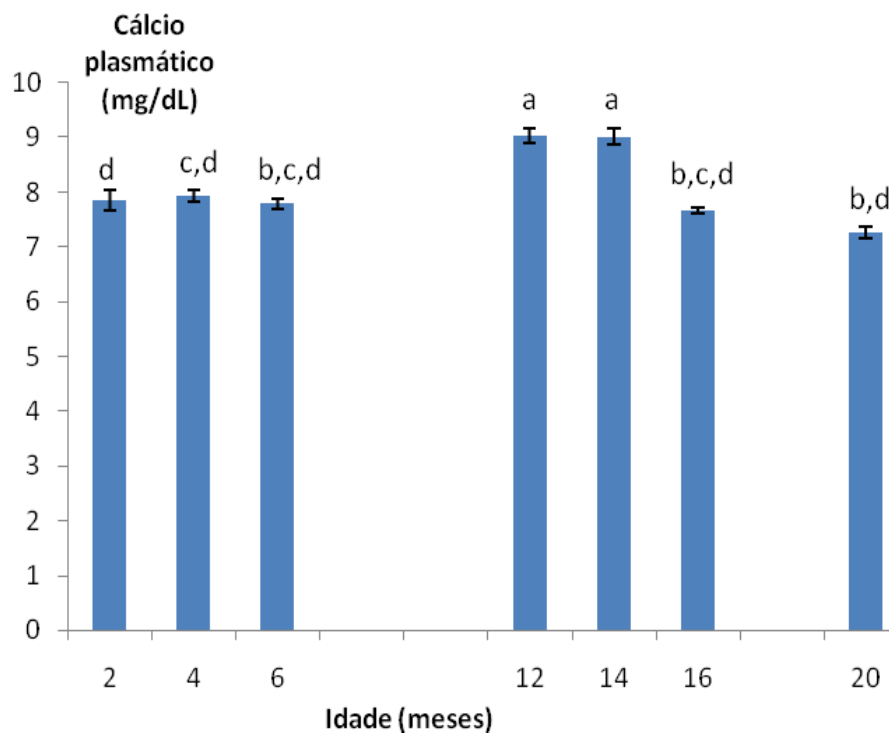


Figura 11 Nível de cálcio plasmático (mg/dL) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

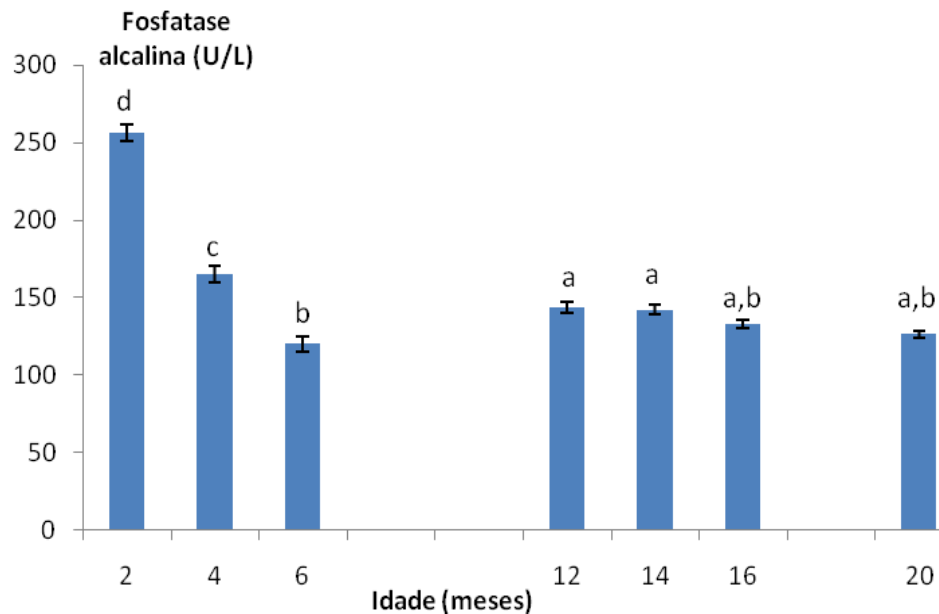


Figura 12 Nível de fosfatase alcalina plasmática (U/L) de ratos Wistar relacionada à idade. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

As características morfométricas e biofísicas do fêmur dos grupos com 2, 4, 6, 12, 14, 16 e 20 meses apresentaram divergências, fazendo-se notar um acentuado pico dos valores de comprimento, diâmetro, força, rigidez, área óssea, peso, quantidade, conteúdo e densidade mineral óssea nos animais com 12 meses.

4.4 Comprimento e Diâmetro Ósseo (mm)

O comprimento e diâmetro ósseo do fêmur obtidos dos ratos com até seis meses de idade foram menores quando comparados com os animais plenamente desenvolvidos em sua estrutura óssea (12 meses) (Fig. 13 e 16). Os animais de 20 meses apresentaram uma diminuição do comprimento do fêmur em relação ao grupo de 12 meses (Fig. 13).

Ao correlacionar a variável comprimento do fêmur com a massa corpórea e com o comprimento do animal, obteve-se um $R^2 = 0,888$ e $R^2 = 0,851$, respectivamente, indicando que o comprimento do fêmur é explicado em 89% pela variação da massa corpórea (Fig. 14) e em 85% pela variação do comprimento do animal (Fig. 15).

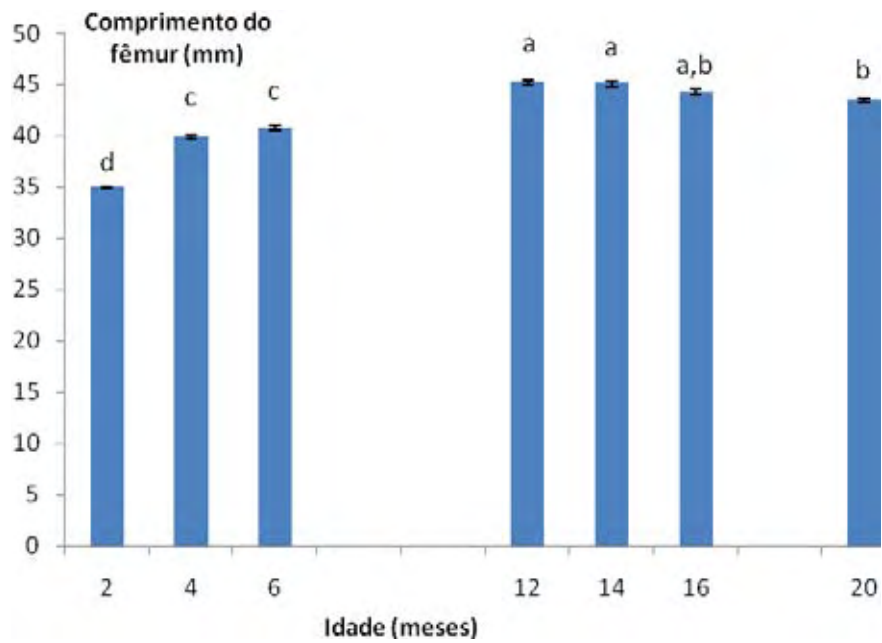


Figura 13 Comprimento do fêmur em ratos Wistar relacionado à idade. Dados apresentados como Média ± Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

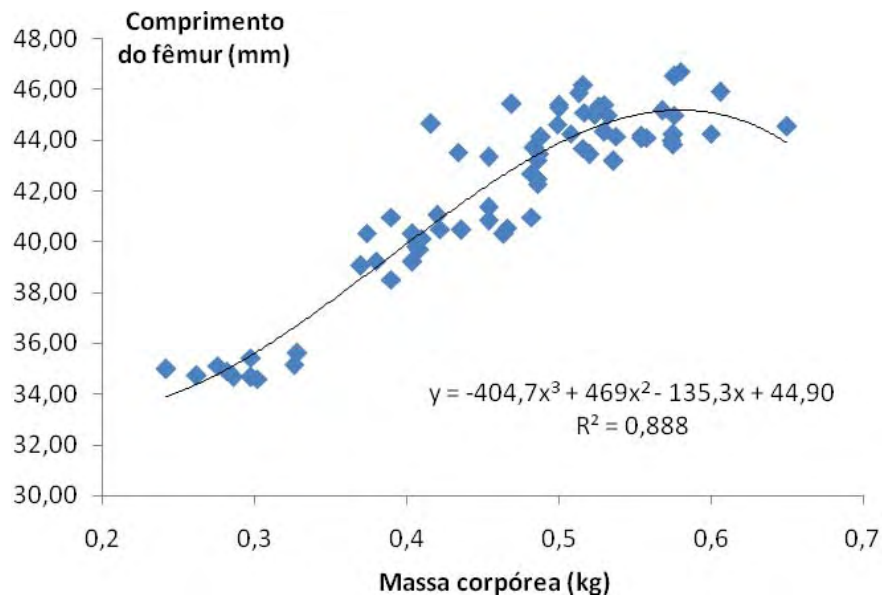


Figura 14 Correlação entre o comprimento do fêmur (mm) e a massa corpórea (g) de ratos Wistar. O $R^2 = 0,888$ indica que o comprimento do fêmur é explicado em 89% pela variação da massa corpórea.

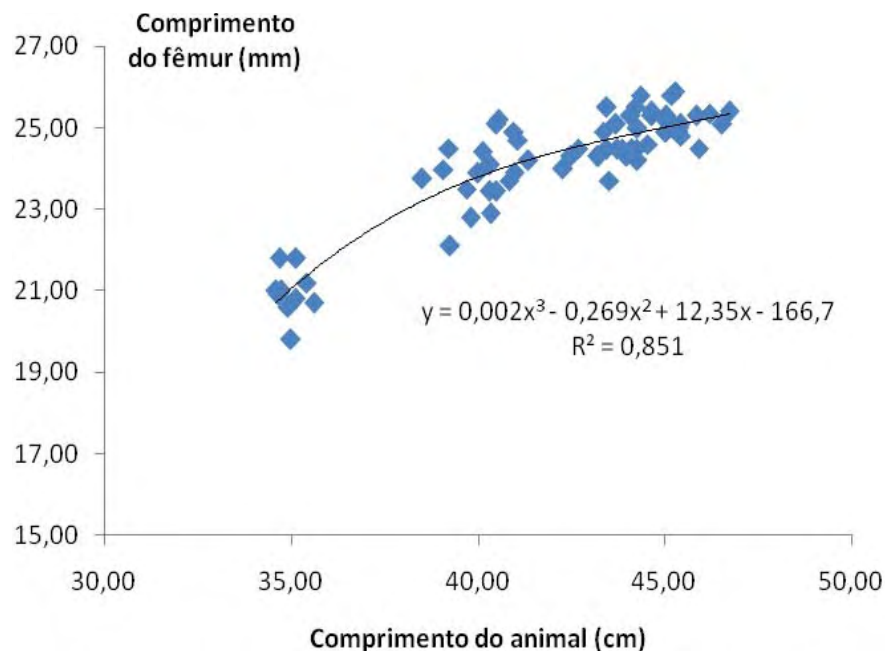


Figura 15 Correlação entre o comprimento do fêmur (mm) e o comprimento (cm) de ratos Wistar. O $R^2 = 0,851$ indica que o comprimento do fêmur é explicado em 85% pela variação do comprimento do animal.

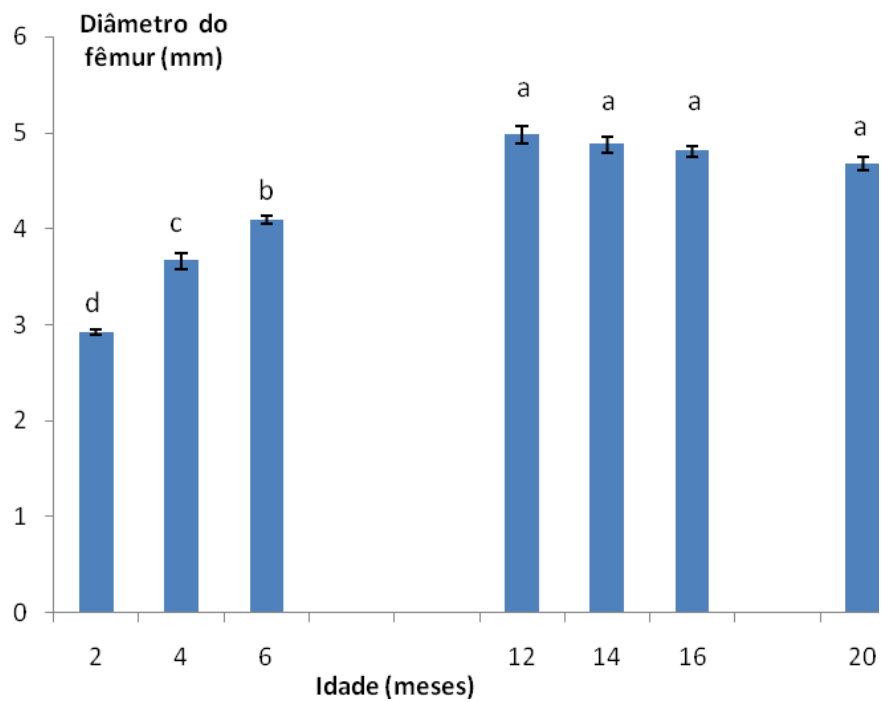


Figura 16 Efeito da idade sobre o diâmetro do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.5 Força Máxima (N) – Compressão Axial e Flexão em três pontos

Com referência à força máxima admitida pela cabeça e terço médio do fêmur antes da fratura, ela é menor no grupo de 2 meses de idade do que nos demais grupos ($p < 0,05$), ocorreu pico aos 12 meses de idade mantendo se aos 14 meses de idade, diferindo estes grupos dos demais grupos ($p < 0,05$) (Fig. 17 e 18), o que mostra mais resistência.

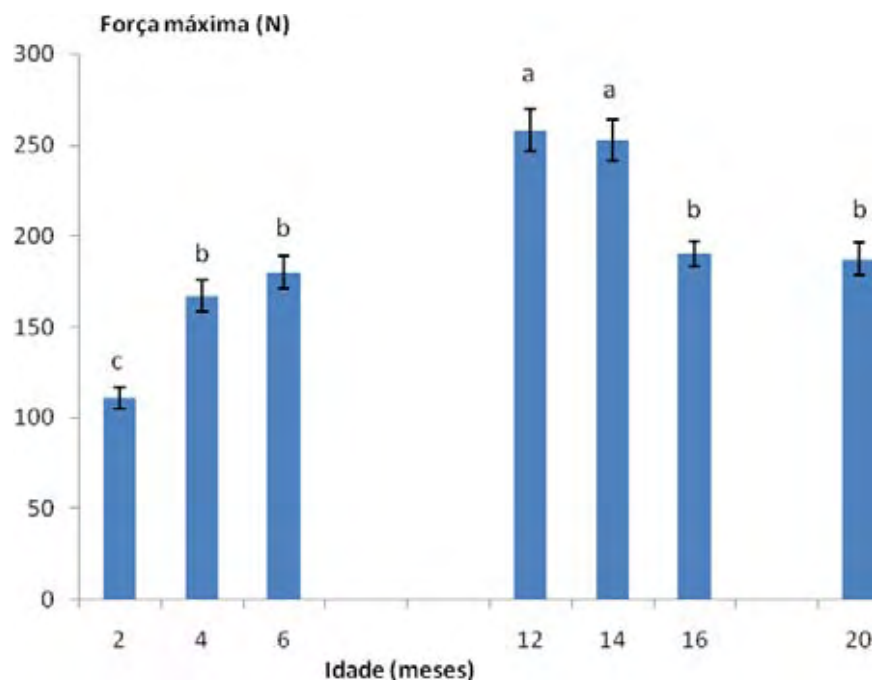


Figura 17 Efeito da idade sobre a Força Máxima admitida pela cabeça do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

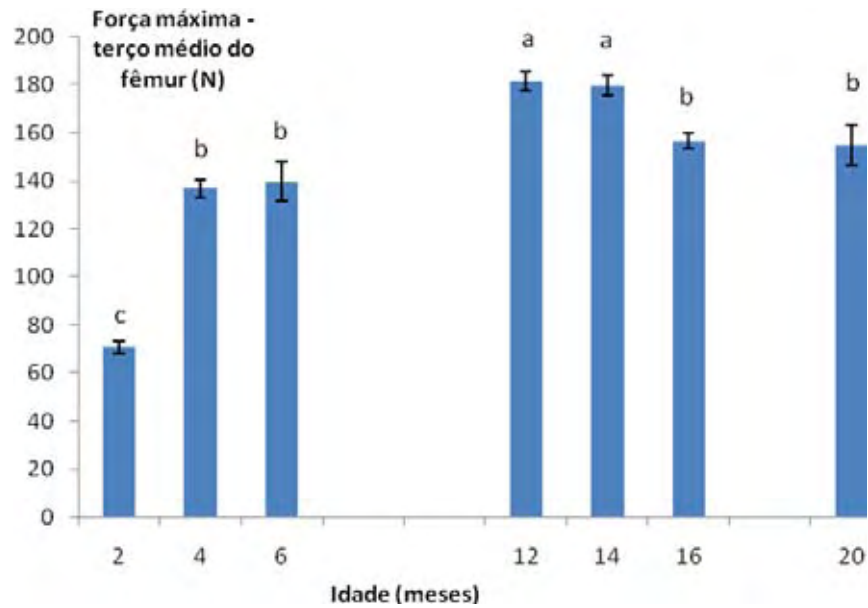


Figura 18 Efeito da idade sobre a Força Máxima admitida pelo terço médio do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.6 Rigidez (N/mm) – cabeça do fêmur (compressão axial) e terço médio (flexão a 3 pontos) do fêmur.

Assemelhando-se ao verificado no ensaio de força máxima, a rigidez obtida na cabeça e terço médio do fêmur foram notadamente maiores nos animais com 12 meses ($p < 0,05$), mantendo-se aos 14 meses de idade (Fig. 19 e 20).

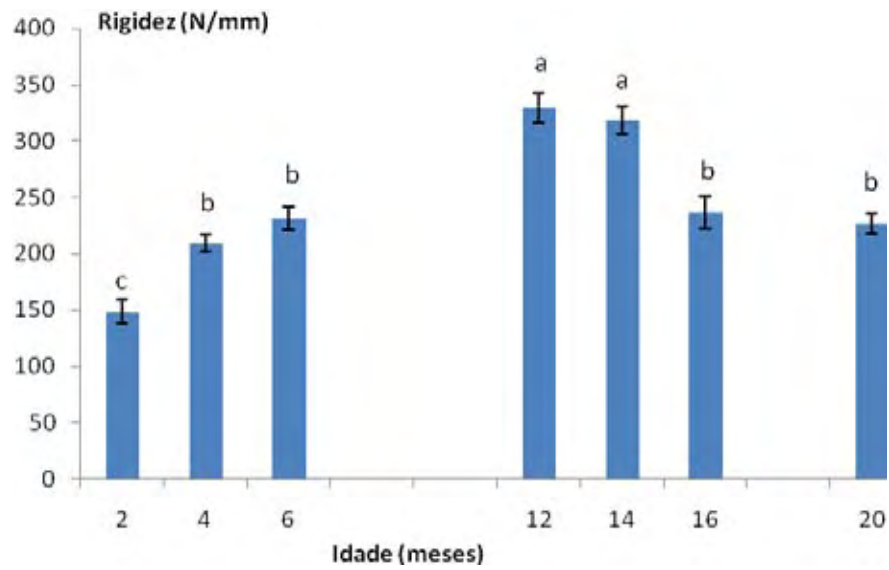


Figura 19 Efeito da idade sobre a rigidez da região proximal do fêmur (cabeça e colo) em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

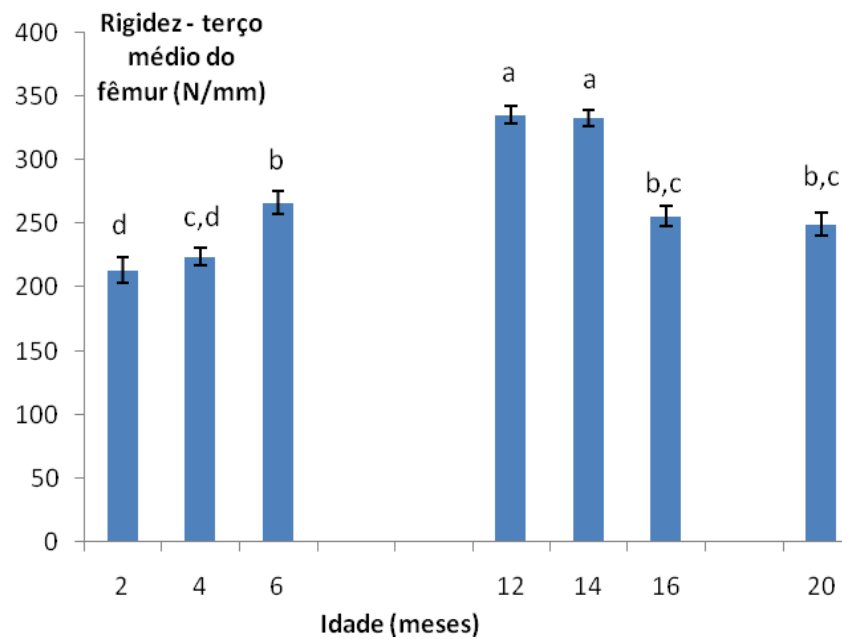


Figura 20 Efeito da idade sobre a rigidez do terço médio do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

4.7 Área Óssea (cm^2), Conteúdo Mineral Ósseo - CMO (g) e Densidade Mineral Óssea - DMO (g/cm^2) da região de cabeça e colo femoral e de todo fêmur.

Valores maiores de área, conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea do fêmur e da cabeça do fêmur foram constatados nos animais com 12 meses, de modo particular quando confrontados com os extremos de idade (Fig. 21, 22, 23 e 24).

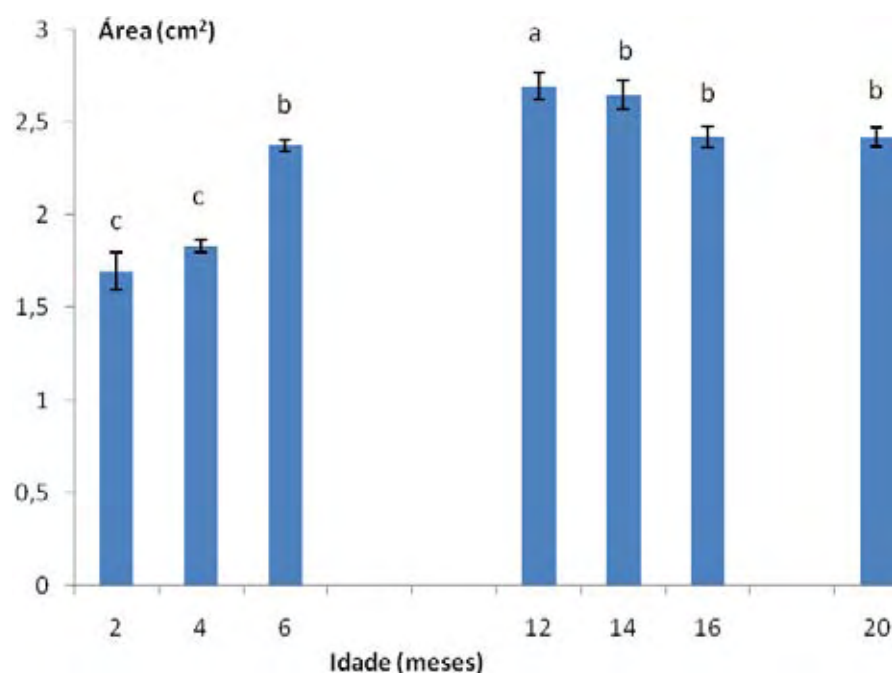


Figura 21 Efeito da idade sobre a área óssea do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

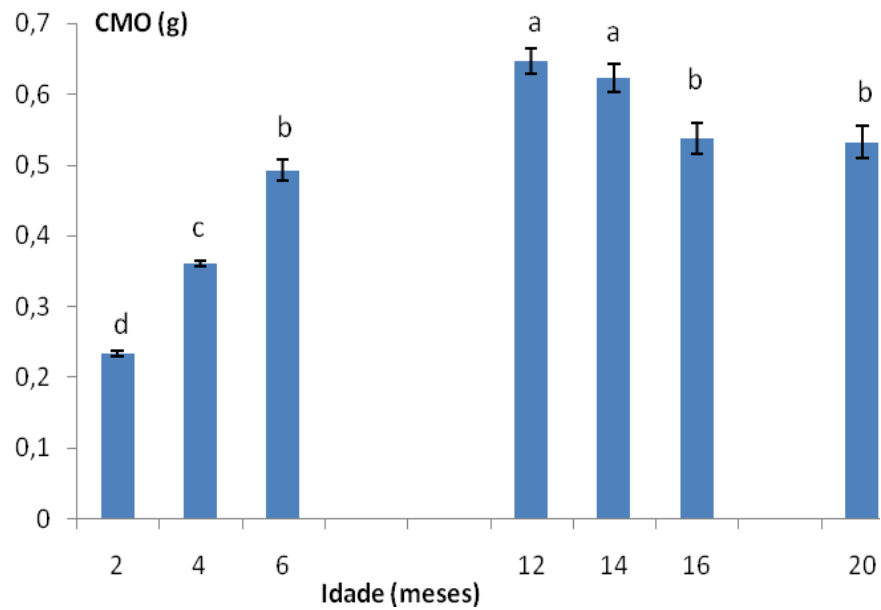


Figura 22 Efeito da idade sobre o conteúdo mineral ósseo do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

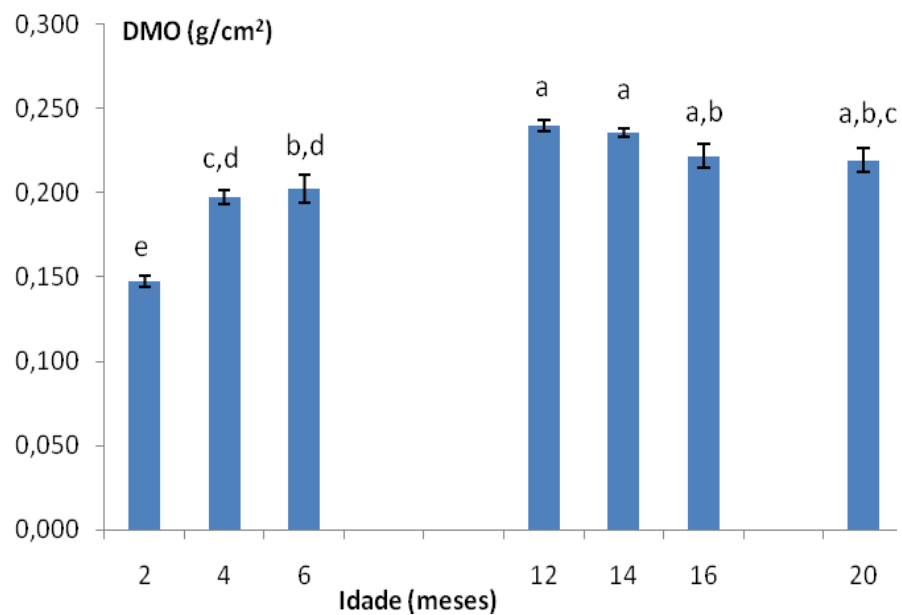


Figura 23 Efeito da idade sobre a densidade mineral óssea do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

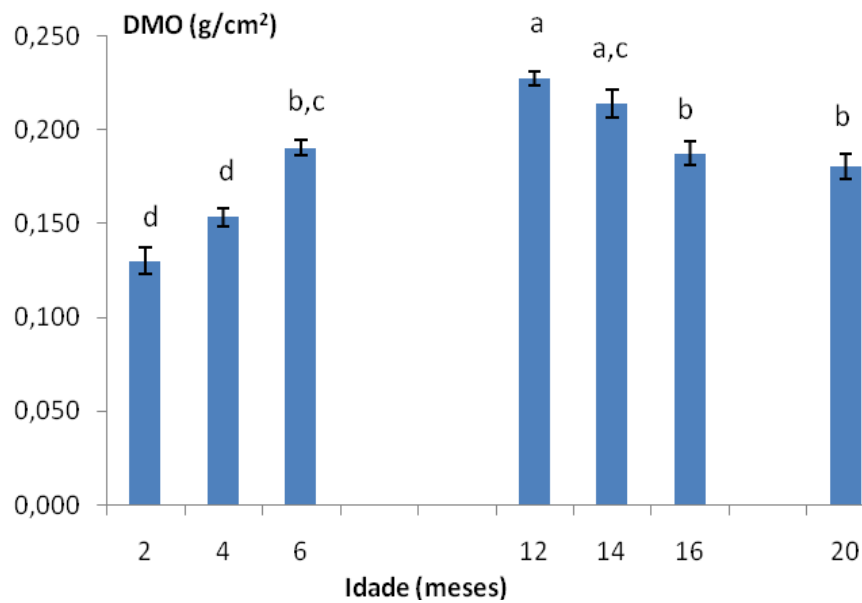


Figura 24 Efeito da idade sobre a densidade mineral óssea da região da cabeça e colo do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Após correlação obteve-se que a densidade mineral óssea é explicada em 68% pela massa corpórea dos animais e também em 71% pela variação da idade dos animais (Fig. 25 e Fig. 26).

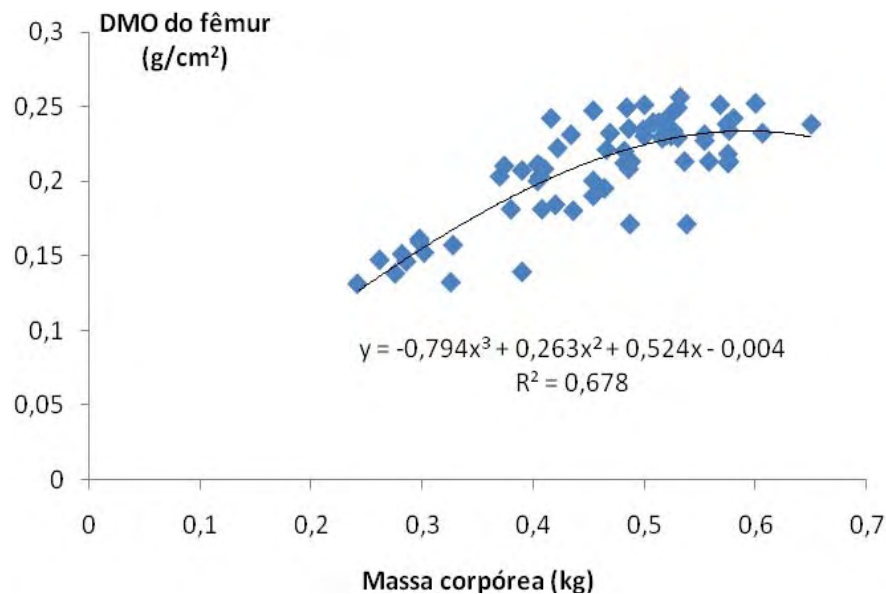


Figura 25 Correlação entre densidade mineral óssea do fêmur (g/cm^2) e massa corpórea (g) de ratos Wistar. O $R^2 = 0,678$ indica que a densidade mineral óssea é explicada em 68% pela variação da massa corpórea dos animais.

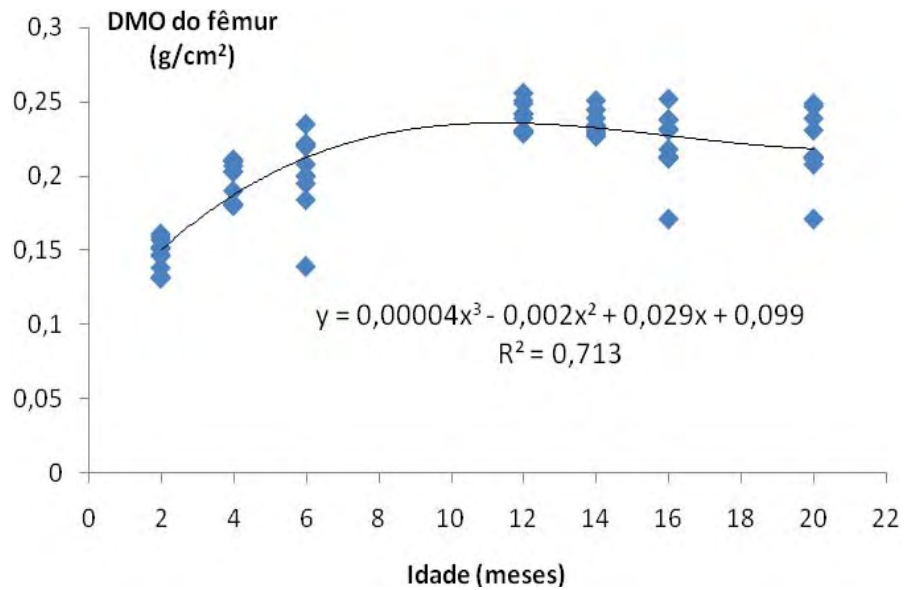


Figura 26 Correlação entre densidade mineral óssea do fêmur (g/cm²) e a idade (meses) de ratos Wistar. O $R^2 = 0,713$ indica que a densidade mineral óssea é explicada em 71% pela variação da idade dos animais.

4.8 Massa dos fêmures e Quantidade de Material Mineral (cinzas) dos fêmures (g)

O peso e a quantidade de material mineral dos fêmures foram maiores nos animais com 12 meses em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$), mantendo-se aos 14 meses em relação aos 12 meses onde, nota-se maior formação óssea com os animais de 2 meses, o auge aos 12 meses e seu declínio com os animais de 16 e 20 meses (Fig. 27 e 28).

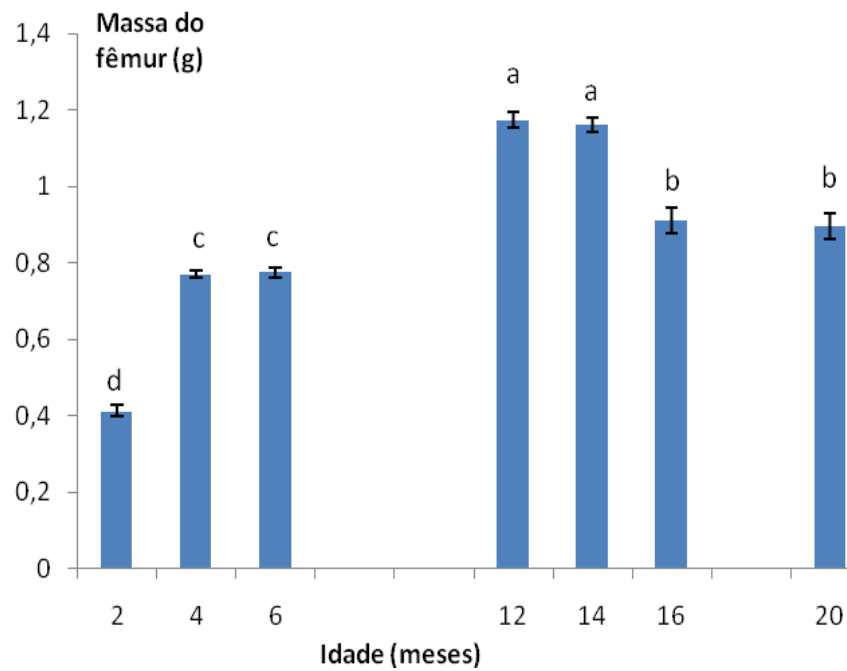


Figura 27 Efeito da idade sobre a massa do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

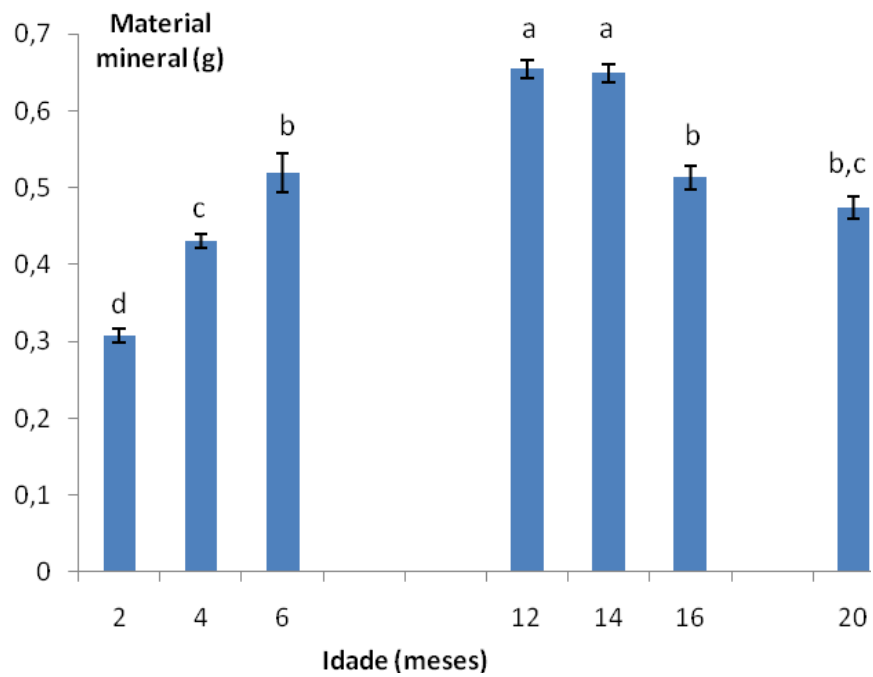


Figura 28 Efeito da idade sobre a quantidade de material mineral do fêmur em ratos Wistar. Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média. Letras iguais implicam em ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam em diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4.9 Porosidade Cortical e Conectividade Trabecular

A análise morfométrica da microtomografia do osso trabecular da região da cabeça do fêmur dos grupos de diferentes meses utilizadas neste estudo está apresentada na Figura 29 e na Tabela 1. Ao analisar os valores do volume ósseo percentual, da espessura trabecular, do número de trabéculas por micrômetro de tecido e da separação tecidual da cabeça femoral dos grupos e suas respectivas imagens observa-se que os animais de 12 meses de idade apresentam trabeculado mais consistente, maior conectividade e maior quantidade de massa óssea e os grupos de 16 e 20 meses já apresentam maior porosidade trabecular, trabéculas desorganizadas e com menor conectividade em relação ao grupo de 12 meses.

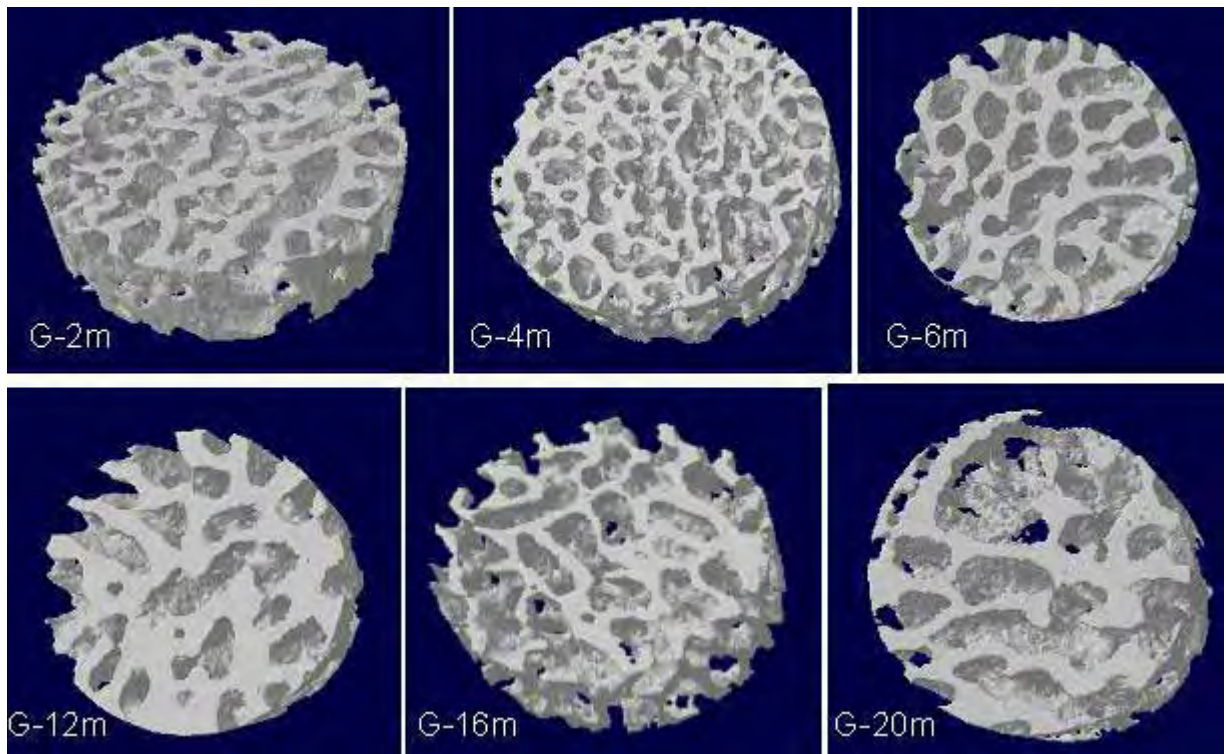


Figura 29 Imagens ósseas, em 3D, da região trabecular da cabeça do fêmur de ratos Wistar de diferentes idades.

Tabela 1 Volume ósseo percentual – BV/TV (%), espessura trabecular – Tb.Th (μm), número de trabéculas – Tb.N ($1/\mu\text{m}$) e separação entre trabéculas – Tb.Sp (μm) dos fêmures dos ratos nos diferentes idades, obtidos pela microtomografia computadorizada. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Idade (meses)					
	2	4	6	12	16	20
BV/TV	38,46 \pm 1,767 ^{a,c}	44,06 \pm 1,194 ^a	43,06 \pm 3,370 ^{a,c}	49,23 \pm 2,795 ^b	37,26 \pm 1,160 ^c	38,15 \pm 1,764 ^{a,c}
Tb.Th	78,82 \pm 1,687 ^a	83,22 \pm 0,43 ^{a,b}	97,45 \pm 6,133 ^{b,d}	136,96 \pm 3,24 ^c	92,97 \pm 2,111 ^{a,b,d}	102,43 \pm 6,15 ^d
Tb.N	0,00489 \pm 0,00017 ^{a,b}	0,00529 \pm 0,00010 ^a	0,00444 \pm 0,00007 ^{b,d}	0,00359 \pm 0,00008 ^c	0,00401 \pm 0,00006 ^{c,d}	0,00393 \pm 0,0001175 ^c
Tb.Sp	133,32 \pm 4,789 ^{a,b}	121,15 \pm 3,864 ^a	143,67 \pm 4,340 ^{b,d}	183,72 \pm 5,579 ^c	161,84 \pm 1,079 ^{d,e}	170,33 \pm 6,756 ^{c,e}

4.10 Análise histológica qualitativa

Em G-2m (Figura 30), uma camada de cartilagem hialina rica em condrócitos e de média espessura revestia a superfície articular. O osso na epífise se mostrava constituído por uma delgada camada de tecido ósseo compacto no interior da qual, ficava confinada uma rica rede de delgadas trabéculas ósseas delimitando amplos espaços medulares ocupados por medula óssea vermelha. O disco epifisário se mostrava ainda bastante espesso e composto pela zona de cartilagem hialina em repouso, zona de cartilagem seriada, zona de cartilagem hipertrófica, zona de cartilagem mineralizada e zona de ossificação endocondral. Nesta última zona, constatava-se uma rica rede de vasos sanguíneos invadindo as trabéculas ósseas recém-formadas. A maior parte do tecido ósseo observado nas adjacências do disco epifisário apresentava-se apoiado sobre um eixo interno de cartilagem mineralizada. Neste território, o tecido ósseo das delgadas trabéculas se mostrava com poucos osteócitos incluídos na matriz, no entanto, revestido por osteoblastos exibindo características morfológicas de intensa atividade de síntese. Muitos osteoclastos foram observados esparsamente distribuídos entre as trabéculas ósseas neoformadas. Na diáfise, um tecido ósseo compacto formava suas paredes externas. O espesso perióstio apresentava-se subdividido em uma parte externa fibrosa, rica em fibras colágenas, com poucos fibroblastos e uma parte interna celular, rica em células, especialmente células osteoprogenitoras. Na porção interna da cortical óssea, uma pequena extensão de tecido ósseo esponjoso revestido por um endóstio, formado por osteoblastos ativos, delineava uma ampla cavidade medular preenchida por medula óssea vermelha.

As características histológicas apresentadas pelos grupos G-12m (Figura 31) e G-16m (Figura 32) foram muito similares, em função disso, serão descritas em conjunto. A cartilagem hialina situada na superfície articular se mostrou com uma espessura similar àquela apresentada pelo G-2m, no entanto, com uma diminuição da densidade de condrócitos por área, especialmente em sua porção mais profunda. O osso, na epífise, se mostrava constituído por uma cortical bem mais espessa que a apresentada em G-2m. Esta delineava um tecido ósseo esponjoso com trabéculas espessas, no entanto, em número bem menor que aquele apresentado aos 2 meses. Os amplos espaços medulares estavam ocupados por medula óssea vermelha e amarela. Uma delgada linha interrompida e de contornos irregulares se mostrou como

o vestigial do disco epifisário. Nas adjacências dessa linha, as trabéculas ósseas se apresentavam espessas, ricas em osteócitos e revestidas externamente por células de revestimento ósseo, sendo raras aquelas envoltas por osteoblastos ativos. A quantidade de osteoclastos se mostrou menor que a apresentada por G-2m. Apesar da espessura avantajada das trabéculas óssea dessa região, sua densidade por área se mostrou bem menor que a apresentada por G-2m. A cortical óssea na diáfise se apresentou bastante espessa, com muito pouco osso esponjoso em sua superfície interna. O perióstio, embora ainda composto por sua parte fibrosa e celular, exibia uma quantidade de células bem reduzida nesta última porção.

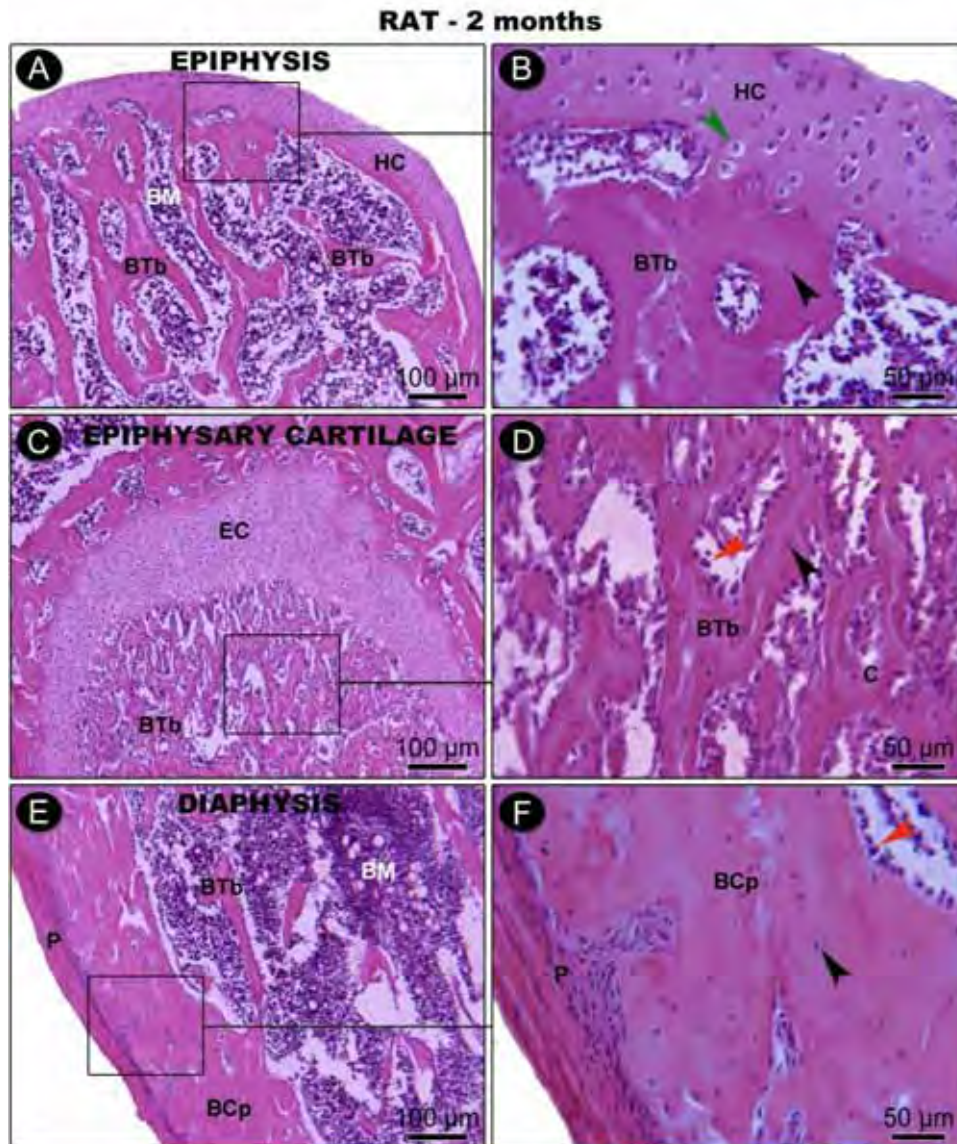


Figura 30 Aspecto histológico da epífise, cartilagem epifisária e diáfise de ratos com 2 meses (G-2m). **A:** fotomicrografia da epífise evidenciando a cartilagem articular (HC), a delgada camada de tecido ósseo compacto, no exterior, e o tecido ósseo esponjoso (BTb), no interior, delimitando amplos espaços medulares ocupados por medula óssea vermelha (BM). **B:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em A. **C:** fotomicrografia da cartilagem epifisária (EC) evidenciando uma extensa área de trabéculas ósseas (BTb) formadas por osteogênese endocondral. **D:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em C mostrando várias trabéculas ósseas apresentando um eixo interno de cartilagem mineralizada (C) e rodeadas por tecido ósseo neoformado. **E:** fotomicrografia da diáfise evidenciando o perióstio (P), a camada de tecido ósseo compacto (BCp), no exterior, e o tecido ósseo esponjoso (BTb), no interior, e parte da cavidade medular e amplos espaços medulares ocupados por medula óssea vermelha (BM). **F:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em E. Abreviações e símbolos: BCp, tecido ósseo compacto; BTb, tecido ósseo esponjoso; BM, medula óssea; C, cartilagem mineralizada; EC, cartilagem epifisária; HC, cartilagem articular; P, perióstio; setas verdes, condrócitos; setas pretas, osteócitos; setas vermelhas, osteoblastos. Coloração: Hematoxilina e eosina (H&E). Barras de escala: A, C e E = 100 μ m, aumento original 100x; B, D e F = 50 μ m, aumento original 400x.

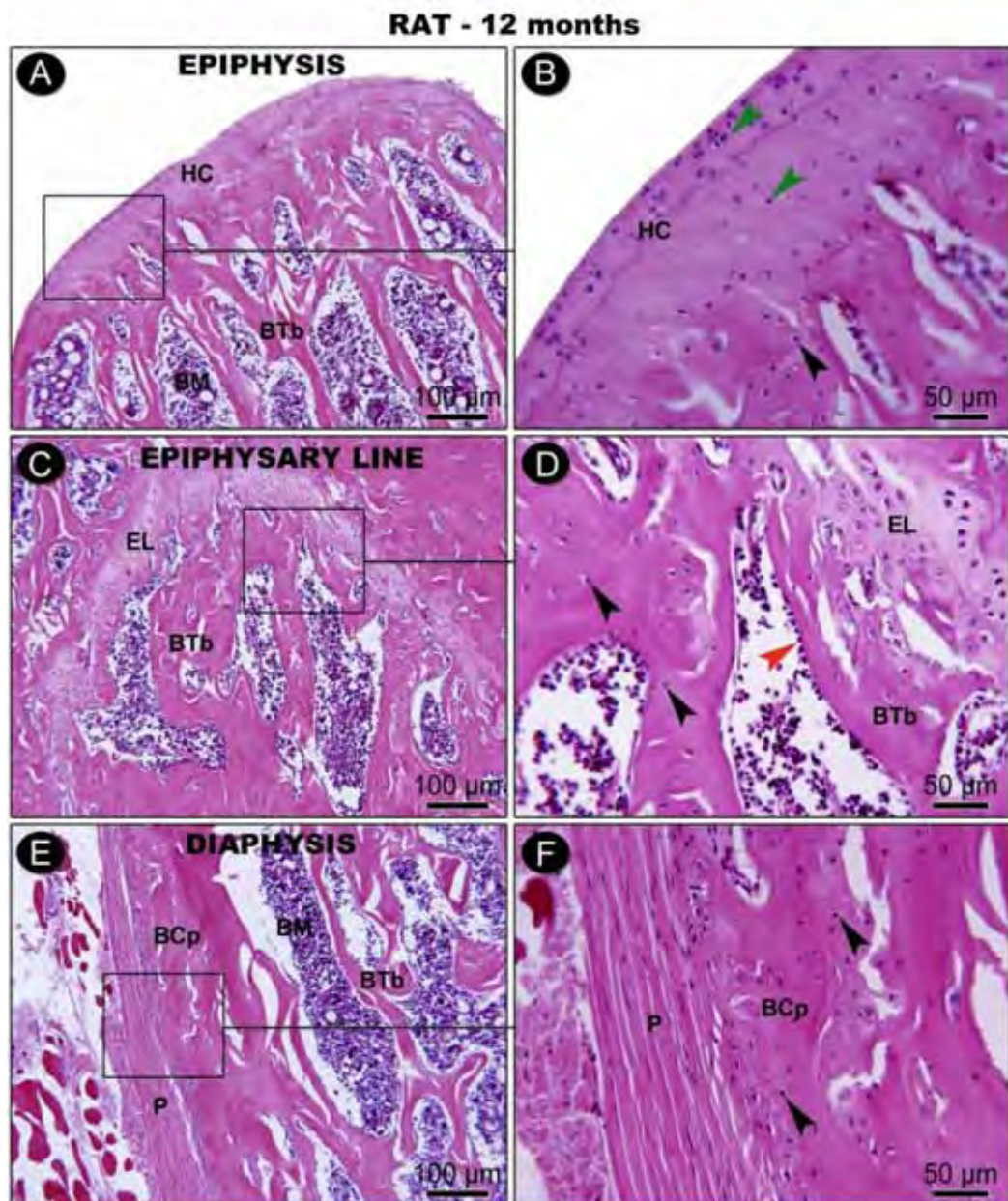


Figura 31 Aspecto histológico da epífise, linha epifisária e diáfise de ratos com 12 meses (G-12m). **A:** fotomicrografia da epífise evidenciando a cartilagem articular (HC), pouco celularizada, o tecido ósseo compacto, no exterior, e o tecido ósseo esponjoso (BTb), no interior, delimitando amplos espaços medulares ocupados por medula óssea (BM). **B:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em A. **C:** fotomicrografia da linha epifisária (EL), um vestígio da cartilagem epifisária, e uma extensa rede trabéculas ósseas (BTb). **D:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em C. **E:** fotomicrografia da diáfise evidenciando o perióstio (P), com poucas células em sua camada mais interna, uma camada de tecido ósseo compacto (BCp), no exterior, e o tecido ósseo esponjoso (BTb), no interior, e parte da cavidade medular e amplos espaços medulares ocupados por medula óssea vermelha (BM). **F:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em E. Abreviações e símbolos: BCp, tecido ósseo compacto; BTb, tecido ósseo esponjoso; BM, medula óssea; EL, linha epifisária; HC, cartilagem articular; P, perióstio; setas verdes, condrócitos; setas pretas, osteócitos; setas vermelhas, osteoblastos. Coloração: Hematoxilina e eosina (H&E). Barras de escala: A, C e E = 100 μ m, aumento original 100x; B, D e F = 50 μ m, aumento original 400x.

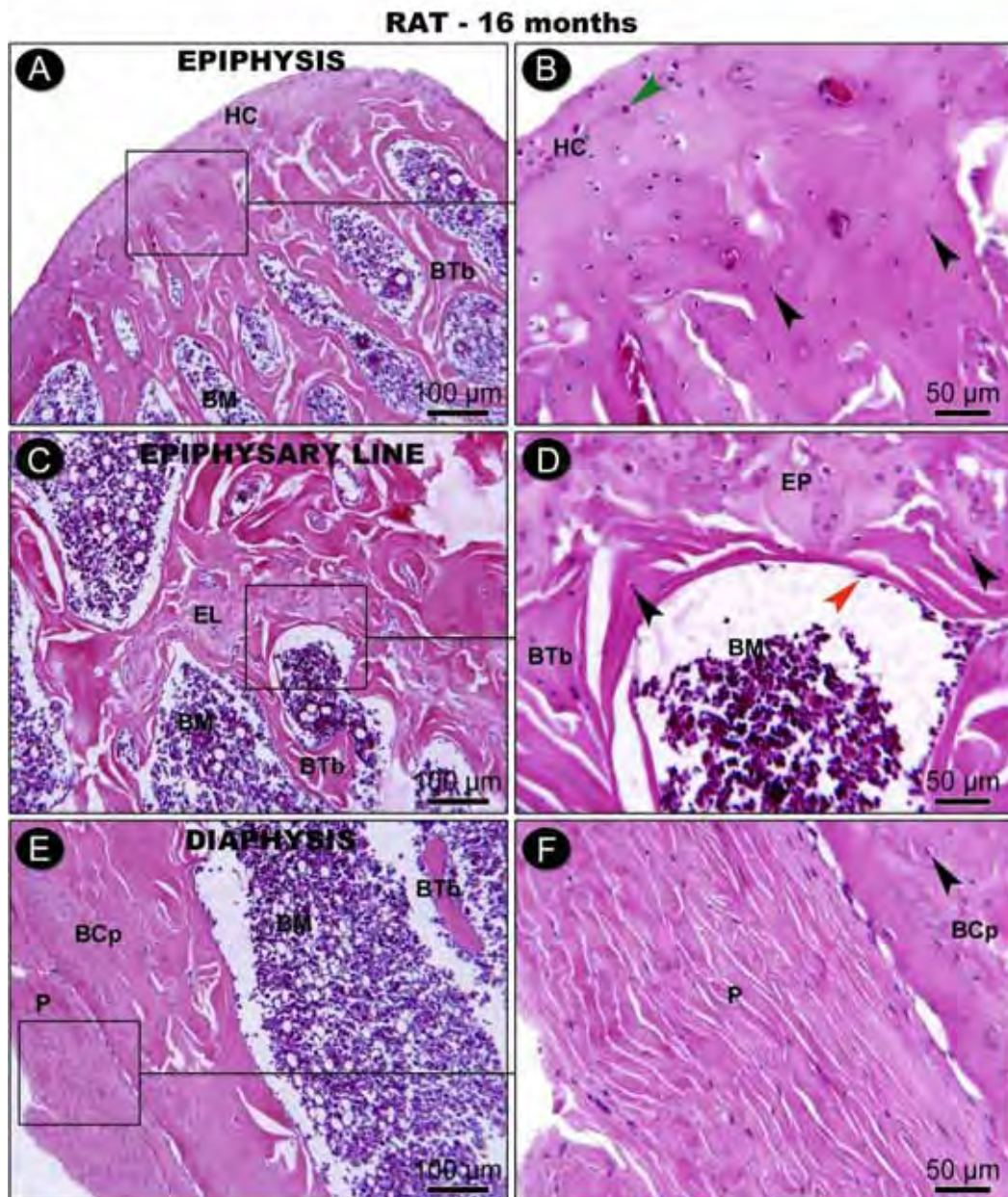


Figura 32 Aspecto histológico da epífise, linha epifisária e diáfise de ratos com 16 meses (G-16m). **A:** fotomicrografia da epífise evidenciando a cartilagem articular (HC), pouco celularizada, o tecido ósseo compacto, no exterior, e o tecido ósseo esponjoso (BTb), no interior, delimitando amplos espaços medulares ocupados por medula óssea (BM). **B:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em A. **C:** fotomicrografia da linha epifisária (EL), um vestígio da cartilagem epifisária, e uma extensa rede trabéculas ósseas (BTb). **D:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em C. **E:** fotomicrografia da diáfise evidenciando o perióstio (P), com muito poucas células em sua camada mais interna, uma camada de tecido ósseo compacto (BCp), no exterior, e o tecido ósseo esponjoso (BTb), no interior, e parte da cavidade medular e amplos espaços medulares ocupados por medula óssea vermelha (BM). **F:** fotomicrografia em maior aumento da região indicada em E. Abreviações e símbolos: BCp, tecido ósseo compacto; BTb, tecido ósseo esponjoso; BM, medula óssea; EL, linha epifisária; HC, cartilagem articular; P, perióstio; setas verdes, condrócitos; setas pretas, osteócitos; setas vermelhas, osteoblastos. Coloração: Hematoxilina e eosina (H&E). Barras de escala: A, C e E = 100 μ m, aumento original 100x; B, D e F = 50 μ m, aumento original 400x.

4.11 Imunomarcção para OC e TRAP

A técnica imunohistoquímica empregada para a detecção de OC e TRAP mostrou alta especificidade para a detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunohistoquímica. As imunomarcações se apresentaram com uma coloração acastanhada confinadas ao compartimento citosólico das células imunorreativas (Figura 33).

A imunomarcção para OC e TRAP foi expressa predominantemente em osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. A imunomarcção para OC foi maior aos 2 meses, onde prevaleceu um alto padrão de marcação. Aos 12 e 16 meses, houve uma redução da imunomarcção, prevalendo um padrão moderado de marcação. A imunomarcção para TRAP foi maior aos 16 meses. Prevaleceu um moderado padrão de marcação aos 2 meses, um baixo padrão de marcação aos 12 meses e um alto padrão de marcação aos 16 meses.

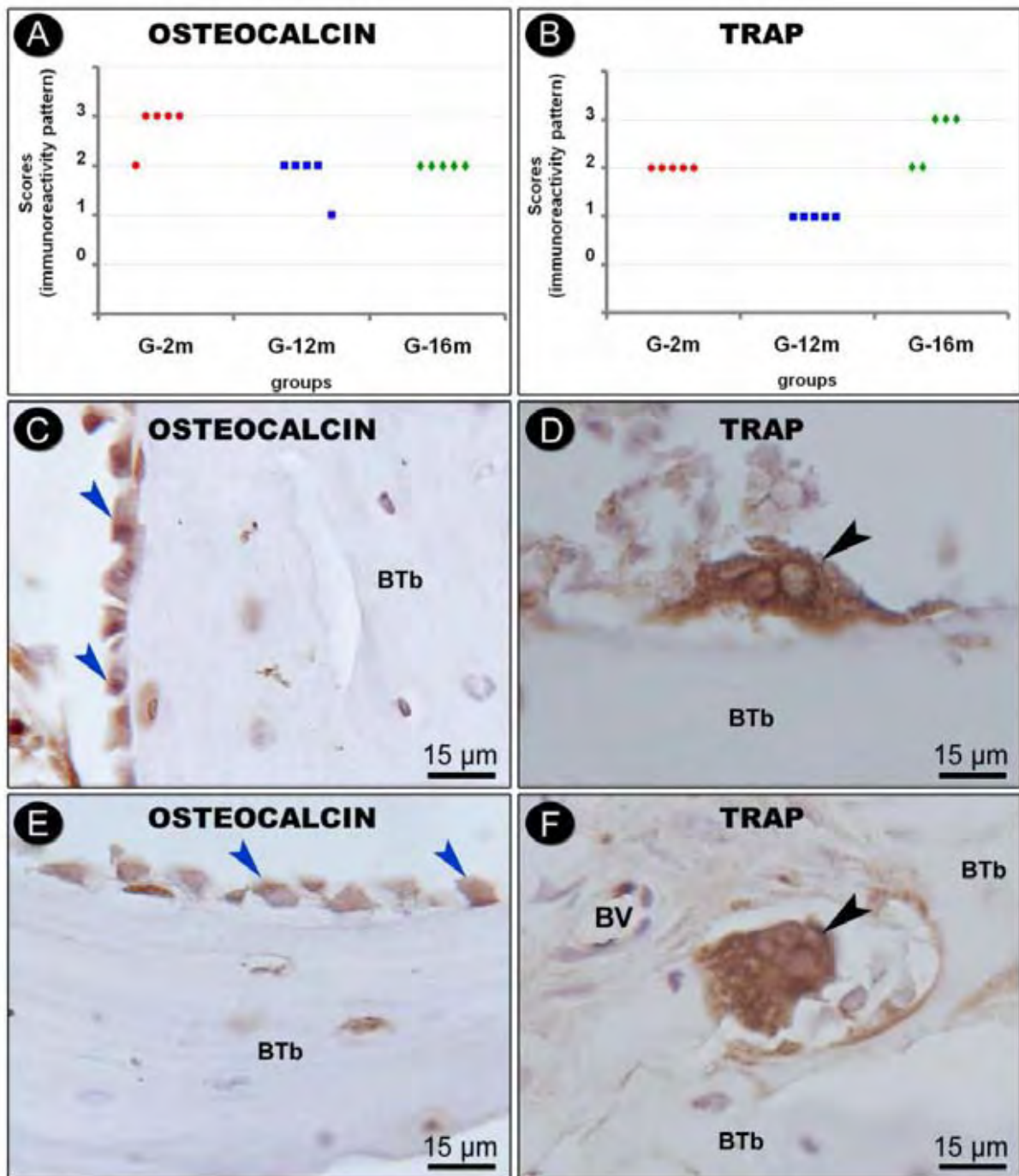


Figura 33

Imunomarcção de OC e TRAP em G-2, G-12m e G-16m. **A-B**: gráficos evidenciando o padrão de imunomarcção para OC (A) e TRAP (B). **C-F** fotomicrografias mostrando osteoblastos OC-positivos (C e E) e osteoclastos TRAP-positivos (D e F). Abreviações e símbolos: BTb, tecido ósseo esponjoso; BV, vaso sanguíneo; setas azuis, osteoblastos; setas pretas, osteoclastos. Barras de escala: C-F = 15 μm, aumento original 2000x.

5 Discussão

Neste trabalho foram determinados parâmetros ósseos fisiológicos de referência para ratos da linhagem Wistar com 2, 4, 6, 12, 14, 16 e 20 meses de idade. A comparação da massa corpórea destes grupos revelou um aumento até os 16 meses, sendo justificado pela fase exponencial de crescimento dos animais com o avanço da idade. Em trabalho realizado com utilização de ratos F344 com 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 27 meses, este aumento foi notado até os 18 meses de idade (BANU et al., 2002) e, em pesquisa realizada em ratos LOU com 4, 20 e 27 meses, o aumento da massa corpórea ocorreu até os 20 meses (DUQUE et al., 2009). No experimento realizado por Wang et al. (2001), houve aumento da massa corpórea em ratos SD, ocorrendo pico da massa corpórea aos 15 meses. Estes dados revelam que há variação da massa corpórea entre o rato Wistar e outros modelos animais, o que deve ser considerado quando estratégias são propostas para delineamento de pesquisas que serão realizadas com intuito de prevenção de doenças em humanos, como a osteoporose.

Em todos os parâmetros biofísicos avaliados neste estudo (comprimento e diâmetro ósseo, força máxima e rigidez, densidade mineral óssea, área, conteúdo mineral ósseo, peso do fêmur e quantidade de material mineral) foi observado um aumento acentuado aos 12 meses de idade, o que concorda com os parâmetros imunohistoquímicos que demonstrou escore moderado para marcador de atividade osteoblástica (osteocalcina) e escore baixo para marcador de atividade osteoclástica (TRAP).

A literatura apresenta alguns parâmetros biofísicos para outros modelos animais, como ratos LOU, SD e F344 (BANU et al., 2002; DUQUE et al., 2009; HALLORAN et al., 2002; TSUJIO et al., 2009; WANG et al., 2001). Todavia, informações que dizem respeito à mensuração de valores dos parâmetros biofísicos em *Rattus norvegicus albinus* de diversas faixas etárias são escassas e, por isso, há dificuldades para comparação dos resultados.

Ao comparar a área, DMO e CMO do fêmur dos animais com 12 meses de idade, com trabalho de Tsujio et al. (2009), que utilizaram ratos F344 de aproximadamente 12,7 -13,2 meses de idade, observamos que não há variação da área do fêmur. Entretanto, os valores da DMO e do CMO dos animais de nosso estudo são maiores do que os encontrados por estes pesquisadores.

Neste estudo, o diâmetro mensurado na região de terço médio do fêmur apresentou aumento com o avanço da idade, atingindo pico aos 12 meses e mantendo-se aos 14, 16 e 20 meses de idade. A literatura relata que em ratos F344 de 8, 28 e 36 meses houve expansão do diâmetro externo, mas do osso tíbia, obtendo aumento significativo ao comparar a tíbia dos animais de 8 meses com aqueles de 36 meses (LaMOTHE et al., 2003). Em nosso trabalho, o valor do diâmetro mensurado na região média do fêmur do rato Wistar aos 12 meses apresentou valor similar ao observado por Kiebzak et al. (1988).

O aumento do comprimento, diâmetro, área, CMO, DMO, peso e quantidade de MM do fêmur até os 12 meses de idade podem ser justificados pois, é sabido que ratos têm crescimento ósseo constante (KALU, 1991), correlacionados com comprimento, diâmetro e área, sendo o crescimento do esqueleto regulado por sistema de feedback dominante, onde o osso se adapta a esforços mecânicos pelo processo de remodelação óssea. Assim, a massa óssea (correlacionada com CMO, DMO e MM) é ajustada com intuito de sua manutenção dentro da faixa aceitável para suportar tensões mecânicas estabelecidas, inclusive pelo próprio peso corporal (FROST, 1983, 1987).

Em nossos resultados, assim como em humanos idosos (CURREY et al., 1996; NALLA et al., 2004; ZIOUPOS; CURREY 1998), foi verificada uma redução da DMO da região proximal do fêmur, da resistência e qualidade óssea a partir de 16 meses, e um aumento da marcação de osteoclastos neste animais. Duque et al. (2009) associam variações da DMO e arquitetura óssea a baixos níveis de remodelação óssea em ratos e afirmam que estas são características típicas da perda óssea relacionada à idade. Em nosso estudo, os animais com 16 meses tiveram redução significativa de parâmetros biofísicos (peso, MM e CMO do fêmur, DMO região proximal do fêmur, rigidez e Fmax do fêmur), tornando-se mais acentuado aos 20 meses de idade. Este fato remete ao princípio de que a perda das propriedades ósseas está diretamente relacionada ao envelhecimento (CARVALHO, 2006; CHAN; DUQUE, 2002). Nyman et al. (2007) constataram que o aumento da idade afetou os parâmetros mecânicos (dentre eles energia e força) do osso ao estudar osso cortical de cadáveres humanos, onde comparou ossos de indivíduos de dois grupos etários: de meia-idade (51 a 56 anos, n = 9) e idosos (72 a 90 anos de idade).

Jepsen (2009) enfatiza que as características morfológicas que determinam a força óssea são a forma e o tamanho dos ossos. Apesar da não haver fechamento

epifisário em ratos, o crescimento diminui consideravelmente no animal idoso (BILEZIKIAN et al., 2008). Este achado foi igualmente verificado em nosso estudo nos parâmetros de comprimento, diâmetro e área do fêmur dos animais de 20 meses de idade. Em nossa pesquisa, os valores apresentados para comprimento ósseo do fêmur de ratos Wistar foram maiores que o comprimento ósseo apresentado para ratos F344 com 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 27 meses (BANU et al., 2002).

Para força máxima admitida pela cabeça e terço médio do fêmur (variável esta que expressa a resistência óssea), foi observada, respectivamente, uma redução de aproximadamente 26,3% e 13,8% aos 16 meses e 27,4% e 14,6% aos 20 meses de idade em relação ao pico de força máxima aos 12 meses de idade. A rigidez avaliada na região da cabeça e terço médio do fêmur mostraram uma redução de 28,1% e 23,8%, respectivamente, no grupo de 16 meses em relação ao grupo de 12 meses de idade e uma redução de 31,1% (cabeça do fêmur) e 25,7% (terço médio) no grupo de 20 meses em relação ao pico aos 12 meses de idade, sendo que, esta variável também expressa a resistência do osso. Para DMO do fêmur todo foi constatado redução de aproximadamente 7,5% e 8,3% aos 16 e 20 meses de idade, respectivamente, em relação aos 12 meses e para DMO da região proximal do fêmur redução de 17,6% aos 16 meses e 20,7% aos 20 meses. A literatura afirma que a DMO é uma medida substituta da massa óssea usada para avaliar o risco de fratura, contribuindo para a resistência óssea, assim como outros fatores envolvidos, como o tamanho do osso, propriedades do material ósseo e a viabilidade do osteócito (O'BRIEN et al., 2004; SEEMAN; DELMAS, 2006; WEINSTEIN, 2000).

No entanto, a perda da resistência óssea é um determinante mais crítico do risco de fratura quando comparado com a perda de massa óssea (HUI et al., 1988; PERZIGIAN, 1973). Na literatura, encontra-se também relatado que o aumento dos níveis de glicocorticóides, relacionado com a idade em ratos, pode levar à perda em número de osteócitos e, como consequência, uma redução da resistência óssea (ALMEIDA et al., 2007; QIU et al., 2003), o que pode-se confirmar com os dados de fosfatase alcalina encontrados em nosso estudo, reforçando a diminuição da atividade osteoblástica nos animais idosos. Deste modo, a maior fragilidade óssea que advém com o envelhecimento inclui também a redução da DMO e da resistência óssea (PERRIEN et al., 2007).

No presente estudo pode-se notar uma perda acentuada da força máxima e rigidez quando comparada à perda da massa óssea (DMO). Assim, os animais com

16 meses de idade já estariam mais propensos a fraturas em função da diminuição da resistência óssea. Estes achados corroboram com outros estudos onde foi relatado que, com o avançar da idade, alterações sutis no grau de mineralização óssea, ou seja, DMO leva a grandes modificações da capacidade de resistência a fraturas ósseas (CARVALHO et al., 2009; WU et al., 2009). Este resultado de uma diminuição menor da DMO em relação a diminuição da força máxima e rigidez pode ser explicado por Ammann e Rizzoli (2003), que em sua pesquisa afirmaram que, apesar de a DMO ser um dos principais determinantes da resistência óssea, algumas mudanças, como perfuração e desaparecimento do osso esponjoso, sem grandes repercussões sobre a DMO, justificaria as alterações da força óssea.

A perda da DMO, força máxima e rigidez apresentou-se mais acentuada na região proximal do fêmur, região de cabeça e colo do que no osso todo e no terço médio do fêmur, o que colabora com a literatura, que afirma que a região superior do fêmur, cabeça e colo sofre uma perda óssea em taxas mais elevadas do que a região inferior, devido a distribuição da tensão imposta sobre o tecido ósseo por causa das atividades diárias (MAYHEW et al., 2005; TURNER, 2007; YOSHIKAWA et al., 1994a).

Em nosso trabalho, os animais de 12 meses de idade apresentaram trabeculado mais consistente, maior conectividade e maior quantidade de massa óssea, colaborando com as variáveis biofísicas encontradas em outros trabalhos, que elucidam pico das características ósseas aos 12 meses. Os grupos de 16 e 20 meses já apresentaram maior porosidade trabecular, desorganização das trabéculas e menor conectividade demonstrando assim a perda de características ósseas nestas idades, concordando com trabalho que afirma que, esta perda óssea está relacionada a menor resistência óssea (SEEMAN, 2008).

Os dados obtidos nesta pesquisa elucidam que a diminuição das propriedades ósseas no rato Wistar já estão presentes aos 16 meses de idade, fornecendo assim, embasamento para que se realize novas pesquisas objetivando estudo do metabolismo ósseo em ratos Wistar idosos, particularmente a partir dos 16 meses de idade.

Com relação aos níveis sanguíneos de fósforo, observou-se um aumento deste mineral nos animais de 6 meses de idade em relação aos de 2 meses. Pode-se notar ocorrência da manutenção da concentração plasmática de fósforo nos animais de 12, 14 e 16 meses. Após este período, ocorreu uma diminuição da concentração de

fósforo, estatisticamente notada quando comparada aos animais de 20 meses frente aos de 12 meses. Como a relação cálcio/fósforo (2:1), respectivamente, é fundamental para formação e remodelação óssea e, ainda como a absorção do cálcio é altamente influenciada pela presença e concentração do fósforo, o balanço adequado, a disponibilidade e absorção de fosfato em nível alimentar, intestinal e renal, implicará no nível ideal destes minerais no organismo e em sua homeostasia sérica.

Desta maneira, pode ser observado em nosso trabalho que durante os primeiros meses de vida houve um aumento gradual das concentrações de fosfato plasmático, que se estabilizou até os 12 meses de idade, período este em que foi constatado maior densidade mineral óssea nos animais e osso cortical bem mais espesso na epífise e diáfise.

Provavelmente, em razão da sua maior exigência durante a formação óssea, a ocorrência do *turnover* do fosfato acarretaria um acúmulo plasmático gradativo deste mineral, particularmente em função da eficiente capacidade de reabsorção deste mineral nos túbulos renais.

O decréscimo da concentração plasmática de fósforo observada nos animais com 20 meses de idade poderia estar relacionada a menor capacidade de síntese óssea dos integrantes deste grupo (BISTNER et al., 2002). Isto se explicaria pelo fato de que, ao contrário do cálcio, a quantidade de fosfato absorvido no intestino permanece relativamente constante, fazendo-se necessário sua redução para que haja uma otimização da captação de cálcio (THRALL et al., 2007), cuja diminuição é prontamente sentida pelo organismo, diferentemente do fosfato (BISTNER et al., 2002; COLVILLE; BASSERT, 2010; KERR, 2003).

Neste estudo, a concentração plasmática de cálcio não mostrou diferença entre os grupos, com exceção do grupo de 12 meses de idade que apresentou nível de cálcio elevado em relação aos demais grupos. Este fato pode ser explicado, pois, a partir desta idade (12 meses), os animais estão depositando, de modo especial, uma maior quantidade de cálcio ósseo como “reserva”, possivelmente, em virtude do envelhecimento que se instalará nos períodos posteriores e que consumirá a reserva de cálcio ósseo existente (COLVILLE et al., 2010). Desta maneira, com o aumento da necessidade da disponibilidade deste mineral para a constituição do tecido ósseo, forma-se nesta idade o pico de massa óssea, exigindo que o organismo realize maior absorção de cálcio de origem alimentar no intestino por meio da ação do hormônio 1,25 Diidroxicolecalciferol e, também, pela redução da taxa de excreção de cálcio

renal (BISTNER et al., 2002; CUNNINGHAM, 2004). Estes eventos, portanto, proporcionariam uma elevação da concentração deste macromineral no sangue, assim como fora observado neste estudo: animais com 12 meses de idade, com maior densidade mineral óssea, maior concentração plasmática de cálcio e fases nítidas de crescimento e estabilização da concentração de fósforo.

Com referência à fosfatase alcalina plasmática, nota-se que houve uma acentuada redução da sua concentração quando comparados os animais com 2 meses de idade e os demais. Durante o período do estudo foi constatado que a diminuição da fosfatase alcalina ocorreu até os 6 meses de idade, elevando-se aos 12 meses, com posterior manutenção. Faz-se importante mencionar que esta enzima de indução é particularmente sintetizada no fígado, nos epitélios intestinais, renais, placentários e particularmente nos osteoblastos (CUNNINGHAM, 2004; THRALL et al., 2007). Desta maneira, ocorrerá um aumento da atividade sérica de fosfatase alcalina sempre que houver maior atividade osteogênica ou em anormalidades hepáticas (BISTNER et al., 2002; THRALL, 2007).

Embora a remodelação óssea ocorra praticamente por toda a vida, desde o nascimento até o envelhecimento, pode-se perceber a ocorrência de oscilações neste ciclo. O aumento desta isoenzima é particularmente notada em animais jovens, cuja atividade osteoblástica encontra-se em alta (KERR, 2003), observada também pela técnica de imunohistiquímica, onde ocorreu um alto padrão de marcação de osteocalcina no grupo de 2 meses de idade. Esta afirmação poderia esclarecer o aumento da concentração plasmática de fosfatase alcalina encontrada nos animais jovens com 2 meses de idade e sua reelevação nos animais adultos aos 12 meses, quando foi observado o aumento do pico de massa óssea, sugerindo também que, neste período, esteja ocorrendo aumento da atividade osteoblástica e remodelação óssea (THRALL, 2007).

Pesquisadores afirmam que o esqueleto humano, do sexo masculino, sofre mudanças previsíveis da estrutura óssea relacionadas com a idade em que, nas duas primeiras décadas de vida, há um crescimento rápido, seguido de pico da massa óssea por volta dos 35 anos de idade, que persiste por algum tempo e, com o envelhecimento ocorre uma perda gradual e progressiva da estrutura óssea (ALMEIDA et al., 2008; KHOSLA et al., 2001) e, ainda que o osso humano atinge a maturidade com 30-35 anos de idade e depois se deteriora (Mc CALDEN et al., 1993; ZIOUPOS; CURREY, 1998). Deste modo, com o avançar da idade pode-se observar

um aumento da incidência de fratura, devido ao enfraquecimento ósseo gerado em parte por mudanças estruturais na forma e tamanho dos ossos e pela deterioração da condição do material ósseo (ZIOUPOS, 2001). Como em nosso estudo houve uma progressão das características ósseas dos animais até os 12 meses de idade e uma diminuição destas características aos 16 meses de idade, pode-se afirmar que, de acordo com os dados obtidos, ratos Wistar de 12 meses de idade têm características ósseas que correspondem a indivíduos humanos com aproximadamente 35 anos, com perda das características ósseas e fragilidade óssea aos 16 meses de idade, o que se assemelha ao ocorrido em homens de aproximadamente 60 anos de idade.

Os resultados obtidos neste estudo fornecem um panorama das variações temporais dos parâmetros ósseos em ratos Wistar, enfatizando que, as variáveis ósseas são alteradas com o avançar da idade.

6 Conclusões

Conclui-se que há uma progressão das características ósseas de *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos, até 12 meses de idade e uma diminuição dos parâmetros ósseos aos 16 e 20 meses de idade.

Referências

AGUILAR, R.F.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Caetano do Sul: Interbook, 2007. 375p.

ALMEIDA, M.; HAN, L.; MARTIN-MILLAN, M.; PLOTKIN, L.; STEWART, S.; ROBERSON, P.; KOUSTENI, S.; O'BRIEN, C.; BELLIDO, T.; PARFITT, A.; WEINSTEIN, R.; JILKA, R.; MANOLAGAS, S. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. **J. Bio. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 27285-27297, 2007.

ALMEIDA, S.A.; FALEIROS, A.C.G.; TEIXEIRA, D.N.S.; COTA, U.A.; CHICA, J.E.L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 44, n.6, p. 429-432, 2008.

AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; CARVALHO, Y.R.; ROCHA, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

AMMANN, P.; RIZZOLI, R. Bone strength and its determinants. **Osteoporos. Int.**, v. 14, Suppl. 3, p. S13-S18, 2003.

BANU J.; WANG, L.; KALU, D. Age-related changes in bone mineral content and density in intact male F344 rats. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 125-130, 2002.

BERNARD, C. An introduction to the study of experimental medicine. In: Natural Library of Medicine. Images from the history of medicine division. 1865. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 21 dez. 2009.

BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; MARTIN, T.J. **Principles of bone biology**. 3. ed. Amsterdã: Academic Press, 2008, 2v.

BISTNER, S.I.; FORD, R.B.; RAFFE, M.R. **Manual de procedimentos veterinários & tratamento emergencial**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2002. 934 p.

BOYCE, B.; HUGHES, D.; WRIGHT, K.; XING, L.; DAI, A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. **Lab. Invest.**, v. 79, n.2, p. 83-94, 1999.

BRANDÃO, C.M.A.; VIEIRA, J.G.H. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 43, n. 6, p. 401-408, 1999.

CAMPOS, L.; LIPHAUS, B.; SILVA, C.; PEREIRA, R. Osteoporose na infância e na adolescência. **J. Pediatr.**, v. 79, n. 6, p. 481-488, 2003.

CARVALHO, A.A.F.; LOUZADA, M.J.Q.; NAKAMUNE, A.C.M.S. Bone structure, strength and microhardness resulting after hindlimb unloading in rats. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 26, n.3/4, p. 145-150, 2009.

CARVALHO, M.I. Osteoporose: visão do ortopedista. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 41, n. 4, p. 91-97, 2006.

CASSIDY, J. Osteopenia and osteoporosis in children. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 17, n. 2, p. 245-250, 1999.

CHAN, G.; DUQUE, G. Age-related bone loss: old bone, new facts. **Gerontology.**, v. 48, n. 2, p. 62-71, 2002.

COLVILLE, T.; BASSERT, J.M. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 543 p.

COSTA-PAIVA, L.; HOROVITZ, A.P.; SANTOS, A.O.; FONSECHI-CARVASAN, G.A.; PINTO-NETO, A.M. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos reprodutivos. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 25, n. 7, p. 507-512, 2003.

CREALEY, G.; STURGESS, I.; MCELNAY, J.; HUGHES, C. Pharmaceutical care programmes for the elderly: economic issues. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 7, p. 455-465, 2003.

CUNNINGHAM, J.C. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579 p.

CURREY, J.D.; BREAR, K.; ZIOUPOS, P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. **J. Biomech.**, v. 29, n. 2, p. 257–260, 1996.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health. Sci.**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DATTA, H.; NG, W.; WALKER, J.; TUCK, S.; VARANASI, S. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.

DEQUEKER, J.; ORTNER, D.; STIX, A.; CHENG, X.; BRYNS, P.; BOONEN, S. Hip fracture and osteoporosis in a XIIIth Dynasty female skeleton from Lisht, upper Egypt. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, n. 6, p. 881-888, 1997.

DOMINGUEZ, L.J.; DI BELLA, G.; BELVEDERE, M.; BARBAGALLO, M. Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. **Biogerontology**, v. 12, n. 5, p. 397-408, 2011.

DUQUE, G.; RIVAS, D.; LI, W.; LI, A.; HENDERSON, J.; FERLAND, G.; GAUDREAU, P. Age-related bone loss in the LOU/c rat model of healthy ageing. **Exp. Gerontol.**, v. 44, n. 3, p. 183-189, 2009.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies animais de uso corrente. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FARIA, P.E.; OKAMOTO, R.; BONILHA-NETO, R.M.; XAVIER, S.P.; SANTOS, A.C.; SALATA, L.A. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 19, n. 4, p. 393-401, 2008.

FARIA, M.Q.; FRANCESQUINI, S.C.C.; RIBEIRO, A.Q. Estado nutricional e uso de medicamentos por idosos. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 1, p. 127-131, 2010.

FENG, X.; MCDONALD, J.M. Disorders of Bone Remodeling. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 6, p. 121-145, 2011.

FROST, H. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 175, p.286-292, 1983.

FROST, H. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. **Anat. Rec.**, v. 219, n. 1, p.1-9, 1987.

GALLI, J.C. Osteoporose. **Acta Ortop. Bras.**, v. 9, n. 2, p.53-62, 2001.

GILSANZ, V.; SKAGGS, D.; KOVANLIKAYA, A.; SAYRE, J.; LORO, M.; KAUFMAN, F.; KORENMAN, S.G.. Differential effect of race on the axial and appendicular skeletons of children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 5, p. 1420-1427, 1998.

HALLORAN, B.; FERGUSON, V.; SIMSKE, S.; BURGHARDT, A.; VENTON, L.; MAJUMDAR, S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. **J. Bone Miner. Res.**, v. 17, n. 6, p. 1044-1050, 2002.

HARKNESS, J.; WAGNER, J. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993. 238 p.

HAUGE, E.M.; QVESEL, D.; ERIKSEN, E.F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, n. 9, p. 1575–1582, 2001.

HOFF, J.; RLATG, L.V.T. Methods of blood collection in the mouse. **Lab. Animal.**, v. 29, n. 10, p. 47-53, 2000.

HUI, S.; SLEMENDA, C.; JOHNSTON, C.J. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. **J. Clin. Invest.**, v. 81, n. 6, p. 1804-1809, 1988.

JEPSEN, K.L. Systems analysis of bone. **Wiley Interdiscip. Rev. Syst Biol. Med.**, v. 1, n. 1, p. 73-88, 2009.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.**, v. 15, p. 171-192, 1991.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. 436 p.

KHOSLA, S.; MELTON, L.R.; ATKINSON, E.; O'FALLON, W. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 8, p. 3555-3561, 2001.

KIEBZAK, G.M.; SMITH, R.; HOWE, J.C.; SACKTOR, B. Bone mineral content in the senescent rat femur: An assessment using single photon absorptiometry. **J. Bone Miner. Res.**, v. 3, n. 3, p. 311-317, 1988.

KOBAYASHI, T.; KRONENBERG, H. Minireview: transcriptional regulation indevelopment bone. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1012-1017, 2005.

LaMOTHE, J.M.; HEPPLER, R.T.; ZERNICKE, R.F. Selected contribution: bone adaptation with aging and long-term caloric restriction in Fischer 344 x Brown Norway F1-hybrid rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, n. 4, p. 1739-1745, 2003.

LILLIE, L.; TEMPLE, N.; FLORENCE, L. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 15, n. 8, p. 612-616, 1996.

LOUZADA, M.J.Q. Densitometria radiográfica. 2009. 65f. Tese (Livre Docência) Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

MANOLAGAS, S.; BELLIDO, T.; JILKA, R. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of IL-6 and gp130. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 17, n. 2, p. 109-116, 1995.

MARTIN, R. Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1574-1580, 2007.

MAYHEW, P.; THOMAS, C.; CLEMENT, J.; LOVERIDGE, N.; BECK, T.; BONFIELD, W.; BURGOYNE, C.J.; REEVE, J. Relation between age, femoral neck cortical stability, and hip fracture risk. **Lancet**, v. 366, n. 9480, p. 129-135, 2005.

MCCALDEN, R.W.; MCGEOUGH, J.A.; BARKER, M.B.; COURT-BROWN, C.M. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 75, n. 8, p. 1193–1205, 1993.

MEDEIROS, J.P.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, M.J.; EVÊNCIO-NETO, J. Aspectos morfológicos dos ovários de ratas (*Rattus norvegicus albinus*) tratadas com ivermectina. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n. 2, p. 215-218, 2006.

MESSIAS, J.B.; CARACIOLO, M.C.M.; OLIVEIRA, I.M.; MONTARROYOS, U.R.; GUERRA, M.O.; SOUZA, I.A. Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. **Med. Vet.**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2009.

MUNDY, G.R. The effects of TGF- β on bone. **Ciba Found. Symp.**, v. 157, p. 137–143, 1991.

NALLA, R.K.; KRUZIC, J.J.; KINNEY, J.H.; RITCHIE, R.O.. Effect of aging on the toughness of human cortical bone: evaluation by R-curves. **Bone**, v. 35, n. 6, p. 1240–1246, 2004.

NYMAN, J.S.; ROY, A.; TYLER, J.H.; ACUNA, R.L.; GAYLE, H.J.; WANG, X. Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone. **J. Orthop. Res.**, v. 25, n. 3, p. 646-655, 2007.

O'BRIEN, C.; JIA, D.; PLOTKIN, L.; BELLIDO, T.; POWERS, C.; STEWART, S.; MANOLAGAS, S.C.; WEINSTEIN, R.S. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. **Endocrinology.**, v. 145, n. 4, p. 1835-1841, 2004.

PAJAMÄKI, I.; SIEVÄNEN, H.; KANNUS, P.; JOKIHAARA, J.; VUOHELAINEN T.; JÄRVINEN, T. Skeletal effects of estrogen and mechanical loading are structurally distinct. **Bone**, v. 43, n. 4, p. 748-757, 2008.

PARFITT, A.M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. **J. Cell. Biochem.**, v. 55, n. 3, p. 273–286, 1994.

PARFITT, A.M. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, n. 9, p. 1583–1585, 2001.

PEDRINELLI, A.; GARCEZ-LEME, L.E.; NOBRE, R.S.A. Efeito da atividade física no aparelho locomotor do idoso. *Rev. Bras. Ortop.*, v. 44, n. 2, p. 96-101, 2009.

PERRIEN, D.; AKEL, N.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.; SKINNER, R.; SIEGEL, E.; SUVA, L.J.; GADDY, D. Aging alters the skeletal response to disuse in the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 2, p. R988-R996, 2007.

PERZIGIAN, A. Osteoporotic bone loss in two prehistoric Indian populations. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 39,n. 1, p. 87-95, 1973.

PESSAN, V.J.O.; VOLPON, J.B.; SHIMANO, C.A. Ensaio mecânico de flexão nas faces côncava e convexa da diáfise do fêmur de ratas. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 31, n. 7, p. 600-604, 1996.

PIETSCHMANN, P.; SKALICKY, M.; KNEISSEL, M.; RAUNER, M.; HOFBAUER, G.; STUPPHANN, D.; VIIDIK, A. Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 11, p. 1099-1108, 2007.

PINHEIRO, D.C.S.N.; FAVALI, C.B.F.; SOUSA-FILHO, A.A.; SILVA, A.C.M.; FIGUEIRAS, T.M.; LIMA, M.G.S. Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. *Bol. Info. COBEA*, n. 3, p. 6-9, 1997/98.

PRINTZ, M. Radiotelemetry comes of age: perhaps just in time. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 286, n. 5, p. R818-R819, 2004.

QIU, S.; RAO, D.; PALNITKAR, S.; PARFITT, A. Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 9, p. 1657-1663, 2003.

QUINTON, J.F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos**. São Paulo: Roca, 2005. 263 p.

RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 12, p. 3318-3325, 2005.

RICCI, N.A.; KUBOTA, M.T.; CORDEIRO, R.C. Concordância de observações sobre a capacidade funcional de idosos em assistência domiciliar. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 655-662, 2005.

ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. Hormonal and metabolic response to acute exercise: effects of high intensity training. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, p. S227, 2000.

ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. Perfil leucocitário de ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*) submetidos ao exercício resistido crônico. **Biosci. J.**, v. 18, p. 51-63, 2002.

RUSSEL, B. **História do pensamento ocidental**. 4. ed. Rio de Janeiro: Ediouro, 2001. 463 p.

SANTOS, H.B.; MADRUGA, M.S.; BION, F.M.; ANTUNES, N.L.M.; MENDES, K.; AGUIDA, R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. **Cienc. Technol. Aliment.**, v. 24, n.4, p. 613-618, 2004.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

SEEMAN, E. Bone modeling and remodeling. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 19, n. 3, p. 219–233, 2009.

SEEMAN, E.; DELMAS, P. Bone quality: the material and structural basis of bone strength and fragility. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 21, p. 2250-2261, 2006.

SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. The laboratory rat. Boca Raton : CRC, 1998. 214 p.

SILVA, L.K. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa. **Cad. Saúde Pública.**, v. 19, n. 4, p. 987-1003, 2003.

SOUZA, I.; SILVA FILHO, M.N. Necrose avascular da cabeça femoral induzida por corticóide: estudo experimental. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 34, n. 7, p. 439-446, 1999.

TANG, Y.; WU, X.; LEI, W.; PANG, L.; WAN, C.; SHI, Z.; ZHAO, L.; NAGY, T.R.; PENG, X.; HU, J.; FENG, X.; HUL, W.V.; WAN, M.; CAO, X. TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. **Nat. Med.**, v. 15, n. 7, p. 757–765, 2009.

TEIXEIRA, M.A.; CHAGURI, L.C.A.G.; CARISSIMI, A.S.; SOUZA, N.L.; MORI, C.M.C.; GOMES, V.M.W.; POLI NETO, A.; NONOYAMA, K.; MERUSSE, J.L.B. Hematological and biochemical profiles of rats (*Rattus norvegicus*) kept under microenvironmental ventilation system. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 37, n. 5, 2000.

THRALL, M. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

TSUJIO, M.; MIZOROGI, T.; KITAMURA, I.; MAEDA, Y.; NISHIJIMA, K.; KUWAHARA, S.; OHNO, T.; NIIDA, S.; NAGAYA, M.; SAITO, R.; TANAKA, S. Bone mineral analysis through dual energy X-ray absorptiometry in laboratory animals. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 71, n. 11, p. 1493-1497, 2009.

TURNER, C. The biomechanics of hip fracture. **Lancet**, v. 366, n. 9480, p. 98-99, 2005.

TURNER, C. Aging and fragility of bone. **J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.**, v. 7, n.4, p. 342-343, 2007.

VIEIRA, S.; HOSSNE, W.S. Pesquisa médica: A ética e a metodologia. São Paulo: Pioneira, 1998. 161 p.

VOLPON, J.B.; CECIM, P.E.S.; MIYASE, C.I.; GAVA, N.F. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 43, n.10, p. 442-451, 2008.

WANG, L.; BANU, J.; MCMAHAN, C.; KALU, D. Male rodent model of age-related bone loss in men. **Bone**, v. 29, n. 2, p. 141-148, 2001.

WEINSTEIN, R. True strength. **J. Bone Miner. Res.**, v. 15, n. 4, p. 621-625, 2000.

WU, Y.; BERGOT, C.; JOLIVET, E.; ZHOU, L.; LAREDO, J.; BOUSSON, V. Cortical bone mineralization differences between hip-fractured females and controls. A microradiographic study. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 207-212, 2009.

YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H.; HARADA, E.; MURAKAMI, T.; WARIISHI, N.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N. Elatoside E, a new hypoglycemic principle from the root cortex of *Aralia elata* Seem.: structure-related hypoglycemic activity of oleanolic acid glycosides. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 42, p. 1354-1356, 1994a.

YOSHIKAWA, T.; TURNER, C.H.; PEACOCK, M.; SLEMENDA, C.W.; WEAVER, C.M.; TEEGARDEN, D.; MARKWARDT, P.; BURR, D.B. Geometric structure of the femoral neck measured using dual-energy X-ray absorptiometry. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, n. 7, p. 1053-1064, 1994b.

ZIOUPOS, P. Ageing human bone: factors affecting its biomechanical properties and the role of collagen. **J. Biomater. Appl.**, v. 15, n. 3, p. 187-229, 2001.

ZIOUPOS, P.; CURREY, J.D. Changes in the stiffness, strength and toughness of human cortical bone with age. **Bone**, v. 22, n. 1, p. 57-66, 1998.

Anexo A

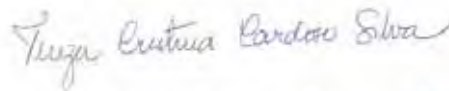


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**PARÂMETROS BIOFÍSICOS, BIOQUÍMICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS DE FÊMURES DE *Rattus norvegicus albinus* EM DIFERENTES IDADES PARA PADRONIZAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA ESTÁTICA E DINÂMICA**" sob responsabilidade do **Prof Dr Mario Jefferson Quirino Louzada** e colaboração de **Juliana de Carvalho Apolinário** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 12/02/2009 de acordo com os protocolos 2008-001232.

Araçatuba, 12 de Fevereiro de 2009



Prof.^a Adj Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP