



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.**

NOELLE EGÍDIA WATANABE KIILL

**EFEITO DA INIBIÇÃO DOS RECEPTORES CANABINÓIDES CB₁ OU
CB₂ DURANTE O PERÍODO NEONATAL SOBRE O DIMORFISMO
SEXUAL ESQUELÉTICO AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO**

ARAÇATUBA-SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia**

NOÉLLE EGÍDIA WATANABE KIILL

**EFEITO DA INIBIÇÃO DOS RECEPTORES CANABINÓIDES CB₁ OU
CB₂ DURANTE O PERÍODO NEONATAL SOBRE O DIMORFISMO
SEXUAL ESQUELÉTICO AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientador: Prof. Tit. Dr. João Cesar Bedran de Castro – FOA/UNESP

Coorientador: Prof. Tit. Dr. José Antunes-Rodrigues – FMRP/USP

ARAÇATUBA-SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

K47e Kiill, Noelle Egídia Watanabe.
Efeito da inibição dos receptores canabinóides CB1;
ou CB2; durante o período neonatal sobre o dimorfismo
sexual esquelético ao longo do desenvolvimento / Noelle
Egídia Watanabe Kiill. - Araçatuba, 2015
45 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. João Cesar Bedran de Castro

Coorientador: Prof. José Antunes Rodrigues

1. Caracteres sexuais 2. Endocanabinóides 3. Receptor CB1
de canabinóide 4. Receptor CB2 de canabinóide 5. Osso e
ossos I. Título.

CDD 612

DEDICATÓRIA

A minha família por apoiarem minhas escolhas, partilharem das minhas lutas, e me incentivarem a seguir em frente. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro, meu orientador, um grande incentivador da ciência e visionário, com ideias além do nosso tempo. Agradeço a oportunidade de partilhar de seu entusiasmo e conhecimento. Sem ele este trabalho não teria sido realizado com sucesso e de forma tão prazerosa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues, um exemplo a ser seguido. Agradeço pelo apoio e pelo incentivo.

Ao Wagner Garcez de Mello, que me faltam palavras para descrever e agradecer sua ajuda e contribuição neste trabalho e em minha formação, acadêmica e pessoal. Também, agradeço a Giseli, Narayana e Olívia por ajudarem a consolidar este grupo de pesquisa e pela ajuda indispensável para a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo e pelas horas divertidas que tivemos durante os experimentos.

À Sociedade Brasileira de Fisiologia e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade concedida.

À Professora Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal, e pelos conselhos quando preciso.

Aos professores Dr. Marcelo Macedo Crivelini e Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada pela ajuda com a parte experimental e por terem nos dado livre acesso aos seus respectivos laboratórios.

Ao Marcelinho, grande amigo, pelos ensinamentos valiosos e por cuidar e se preocupar de nosso grupo de pesquisa. Muito obrigada.

Aos professores do departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, Sandra, Cristina, Ana Cláudia, Antônio, João e Dóris pela convivência e aprendizado durante esta jornada.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Básicas: Gim, Mauro, André, Arnaldo. Também, aos técnicos do Biotério Central da UNESP, pelo apoio prestado em todos os momentos de precisão.

À Valéria, Cristiane e Lilian da seção de pós-graduação, pela ajuda e paciência quando, muitas vezes, solicitado.

Aos amigos, companheiros de departamento e de jornada, e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pelo convívio e aprendizado diário.

À minha segunda família, meus amigos do tênis de mesa. Afinal, tudo começou lá. Vocês mudaram minha vida.

À todos aqueles que, de diferentes formas me ajudaram neste percurso.

MUITO OBRIGADA!

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da CAPES por meio da concessão de bolsa de estudos

EPÍGRAFE

“A ciência vive da dúvida. E a gente não precisa entender tudo para termos uma vida feliz e completa. Eu prefiro viver com a dúvida a ser enganado por uma ilusão”.

(Marcelo Gleiser)

KIILL, N. E. W. **EFEITO DA INIBIÇÃO DOS RECEPTORES ENDOCANABINÓIDES CB₁ OU CB₂ DURANTE O PERÍODO NEONATAL SOBRE O DIMORFISMO SEXUAL ESQUELÉTICO AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO.** 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Fisiologia – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - SBFis. Araçatuba – 2015.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar o impacto da breve bloqueio dos receptores canabinóides CB1 ou CB2 durante o período neonatal sobre o crescimento somático e desenvolvimento esquelético durante a infância, puberdade e na idade adulta em ratos. Ratos Wistar recém-nascidos foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, três grupos do sexo masculino e três grupos femininos. Os grupos tratados receberam durante os primeiros sete dias de vida de uma dose subcutânea de antagonistas dos receptores CB1 (AM251) ou CB₂ (SR144528) (3 mg/kg dissolvidos em 50 uL de veículo composto em álcool absoluto e tampão fosfato salino – PBS). Os grupos controle receberam a solução veículo com mesmo volume e período. O peso corporal foi mensurado aos 20, 40, 120 dias de idade e os fêmures direitos foram coletados. O comprimento e a espessura dos fêmures foram medidos e a densidade mineral óssea areal (DMO areal) foi determinada por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DEXA). O teste biomecânico de flexão da cabeça do fêmur foi utilizado para avaliar a força máxima, a energia para fratura, e rigidez extrínseca dos ossos. Ganho de massa corporal, DMO areal e propriedades biomecânicas do osso aumentaram rapidamente com a idade em todos os grupos. Entre animais veículo, os padrões de dimorfismo sexual esquelética foram evidentes após a puberdade. No entanto, o bloqueio neonatal dos receptores canabinóides CB1 e CB2 promoveu um efeito transitório e sexo-dependentes sobre a massa corporal e desenvolvimento ósseo ao longo da vida, e que a inibição neonatal desses receptores nos machos promoveu um efeito bifásico sobre a aquisição de DMO areal ao longo do desenvolvimento, e aumento da fragilidade óssea nos machos AM251 na idade adulta. Este estudo demonstrou que o breve bloqueio dos receptores canabinóides CB1 ou CB2 no período neonatal provoca uma modificação sexo-dependentes de longa duração no crescimento somático e desenvolvimento esquelético em ratos.

PALAVRAS CHAVE: Dimorfismo Sexual, Sistema endocanabinóide, CB1R, CB2R, Osso

KIILL, N. E. W. **EFFECTS OF NEONATAL CB1 OR CB2 RECEPTORS INHIBITION ON SEXUAL DIMORPHISM IN BONE THROUGHOUT THE DEVELOPMENT**. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Fisiologia – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - SBFis. Araçatuba – 2015.

ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize the impact of brief blockade of cannabinoid CB1 or CB2 receptors during neonatal period on somatic growth and skeletal development during childhood, puberty, and adulthood in rats. Newborn Wistar rats were randomly divided into six groups, three male groups and three female groups. The treated groups received during the firsts seven days of life a subcutaneous dose of a CB1 (AM251) or CB₂ (SR144528) receptors antagonist (3 mg/kg dissolved in 50 µl of a vehicle consisting of absolute ethanol and phosphate buffered saline - PBS). Control groups received the vehicle solution in the same volume and period. Body weight was measured at 20, 40, 120 days of age and femurs were collected. The length and thickness of the femurs were measured and the areal bone mineral density (areal BMD) was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). Biomechanical femoral neck bending testing was used to evaluate bone breaking strength, energy to fracture, and extrinsic stiffness. Weight gain, areal BMD and bone biomechanical properties increased rapidly with respect to age in all groups. In vehicle animals, skeletal sexual dimorphism patterns were evident after puberty. However, neonatal blockade of cannabinoid CB1 and CB2 receptors promoted a transient and sex-dependent effect on the body weight and bone development throughout the life, and that neonatal inhibiting the CB1 and CB2 receptors in males promotes a biphasic effect on the acquisition of areal BMD throughout development, and increased bone fragility in males AM251 in adulthood. This study demonstrated that brief blockade of cannabinoid CB1 or CB2 receptors during neonatal period causes a long-lasting and sex-dependents modification in somatic growth and skeletal development in rats.

KEYWORDS: Sexual Dimorphism, Endocannabinoid System, CB1R, CB2R, Bone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de Curva Força-Deslocamento (modificado de Turner e Burr, 1993)	23
Figura 2 -	Parâmetros Biométricos	26
Figura 3 -	Densitometria Óssea	29
Figura 4 -	Ensaio Mecânico	31

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ 9-THC = Δ 9-tetrahydrocannabinol

CB1 = Cannabinoid binding receptor type 1 (receptor canabinóide tipo 1)

CB2 = Cannabinoid binding receptor type 2 (receptor canabinóide tipo 2)

SNC = sistema nervoso central

AEA = N-araquidoniletanolamida

2-AG = 2-araquidonilglicerol

ECBs = endocanabinóides

FAAH = fatty acid amide hydrolase (ácido graxo amida hidrolase)

MAGL = monoacilglicerol-lipase

ECS = sistema endocanabinóide

CEAA = Comitê de Ética na Experimentação Animal

CMO = conteúdo mineral ósseo

DEXA = densitômetro de dupla emissão de raios-X

DMO areal = densidade mineral óssea areal

EPM = erro padrão da média

PBS = tampão fosfato salino

CB1R = receptor CB1

CB2R = receptor CB2

SUMÁRIO

1.0	Introdução	14
2.0	Objetivos	20
2.1	Objetivos Gerais	20
2.2	Objetivos específicos	20
3.0	Materiais e métodos	21
3.1	Animais e Tratamento	21
3.2	Parâmetros avaliados	21
3.2.1	Biometria	21
3.2.2	Parâmetros biofísicos	22
4.0	Análise estatística	23
5.0	Resultados	25

5.1	O bloqueio neonatal dos receptores canabinóides CB1 e CB2 promoveu efeito transiente e sexo-dependente sobre a massa corporal e desenvolvimento ósseo ao longo da vida	25
5.2	A inibição neonatal dos receptores CB1 e CB2 em machos promove um efeito bifásico sobre a aquisição da DMO areal ao longo do desenvolvimento, e aumento da fragilidade óssea nos machos AM251 na idade adulta	27
6.0	Discussão	32
6.1	Conclusão	34
	Referências	35

Anexos

1.0 INTRODUÇÃO

A Marijuana (*Cannabis sativa*) é uma das drogas mais antigas e amplamente usadas no mundo, mas seu principal componente psicoativo, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), foi purificado apenas na década de 60 (GAONI; MECHOULAM, 1964). Aproximadamente trinta anos após a purificação do Δ^9 -THC um sítio de ligação para este componente químico foi identificado no cérebro de ratos, e em 1990, o primeiro receptor canabinóide, denominado CB_1 (*Cannabinoid binding receptor type 1*), foi clonado (MATSUDA et al., 1990). Posteriormente, um segundo tipo de receptor canabinóide, CB_2 (*Cannabinoid binding receptor type 2*), foi descoberto e clonado (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Ambos receptores pertencem à superfamília de receptores de membrana-ligados-a- proteína-G, sendo que a ativação desses receptores, classicamente, inibe a adenilato-ciclase promovendo fechamento dos canais de cálcio, abertura dos canais de potássio e estimulação de proteínas quinases (GODOY-MATOS et al., 2006).

Os receptores CB_1 são os receptores acoplados a proteína G mais abundantes no sistema nervoso central (SNC), sendo encontrados em diversos segmentos encefálicos, incluindo o hipotálamo e a hipófise (PERTWEE; ROSS, 2002; TSOU et al., 1997), e são responsáveis pela maioria dos efeitos psicoativos dos canabinóides (MACKIE, 2006; PERTWEE; ROSS, 2002). Estão localizados, sobretudo, nos terminais pré-sinápticos dos neurônios (CASTILLO et al., 2012; ELPHICK; EGERTOVA, 2001; KATONA; FREUND, 2012). Os receptores CB_2 , existem em maior quantidade em células do sistema imune, mas também são expressos em algumas regiões do SNC, como nos núcleos hipotalâmicos Ventromedial e Arqueado (GONG et al., 2006; ONAIVI et al., 2006; SVIZENSKA; DUBOVY; SULCOVA, 2008). Ambos os receptores estão presentes em tecidos periféricos (ONAIVI et al., 2006).

A descoberta dos receptores canabinóides sugeria a existência de moléculas endógenas que se ligariam a eles. A partir dessa suposição, em 1992, o primeiro ligante endógeno dos receptores canabinóides foi isolado e recebeu o nome de anandamida (N-araquidoniletanolamida; AEA), do sânscrito “ananda”, “felicidade

eterna” (DEVANE et al., 1992). Logo depois o 2-araquidonilglicerol (2-AG) foi descoberto (MECHOULAM et al., 1995). Assim, os ligantes endógenos dos receptores canabinóides foram denominados endocanabinóides (ECBs). A maior parte dos ECBs identificados são derivados de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, principalmente ácido araquidônico. O AEA e o 2-AG são sintetizados pelas enzimas N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D e diacilglicerol-lipase, respectivamente, e devido a sua natureza lipofílica, não são armazenados em vesículas como outros neuromediadores. Então, são sintetizados sob demanda e sua disponibilidade é regulada por processo de captação e degradação, sendo que o AEA é metabolizado pela *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) (GIANG; CRAVATT, 1997) e o 2-AG é hidrolisado pela monoacilglicerol-lipase (MAGL) (DINH et al., 2002). Ambos ECBs são agonistas dos receptores CB1 e CB2, mas possuem afinidade e eficácia para a ativação destes receptores distintas (RUGINSK et al., 2014). A Anandamida tem maior afinidade aos receptores CB1 em comparação ao 2-AG, mas devido a concentração mais elevada de 2-AG, este parece ser o principal ECBs (KANO, 2014; RUGINSK et al., 2014). Uma peculiaridade da sinalização desses ECBs no SNC é a direção do sinal, uma vez que vão contra a lei da polarização dinâmica de Ramon y Cajal que diz que a transmissão sináptica se dá do terminal pré- para o pós-sináptico (ALGER, 2002). Diferentemente dos outros neuromediadores clássicos, os ECBs normalmente são sintetizados no terminal pós-sináptico e sinalizam de forma retrógrada ao se ligarem em receptores nos neurônios pré-sinápticos (ALGER, 2002; CASTILLO et al., 2012; HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007; KATONA; FREUND, 2012).

Os receptores canabinóides, seus ligantes endógenos e as enzimas que os sintetizam e os degradam, compõem o, como denominado atualmente, sistema endocanabinóide (ECS). Ao longo das últimas duas décadas, o ECS emergiu como um dos principais sistemas envolvidos em vários processos fisiológicos, incluindo o controle do apetite e o balanço energético, a percepção da dor, em respostas imunes, e controle de funções neuroendócrinas (IDRIS; RALSTON, 2010). Respostas sexo-dependentes a administração exógena de canabinóides têm sido observadas frequentemente, e os hormônios gonadais parecem exercer função crucial no dimorfismo sexual desse sistema (FATTORE; FRATTA, 2010).

Uma semana antes do fim da gestação já é possível identificar atividade dos receptores canabinóides e de seus ligantes no cérebro, principalmente ligações dos receptores CB₁. Esse período condiz com a época em que há a expressão fenotípica da maioria dos neurotransmissores (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2004). Além da expressão e atividade precoce, outro aspecto marcante dos receptores canabinóides é que sua distribuição, que diferem entre as fases do desenvolvimento (ROMERO et al., 1997). No cérebro adulto, receptores CB₁ são encontrados principalmente em elementos neurais, mas em estágios anteriores de desenvolvimento, estão localizados em subpopulações de células da glia (SAGAN et al., 1999). A transcrição do mRNA dos receptores CB₁ foi observada durante o período fetal no córtex cerebral, mesencéfalo e no tronco encefálico em níveis muito maiores que no cérebro adulto (BERRENDERO et al., 1999). Durante o período pré-natal os receptores canabinóides estão justapostos com algumas enzimas, como por exemplo, a enzima tirosina hidroxilase, e na fase adulta já não apresentam esta característica, o que foi interpretado como um papel fundamental dos endocanabinóide na expressão gênica dessas enzimas durante o desenvolvimento encefálico (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2004; HERKENHAM et al., 1990; HERNANDEZ et al., 2000).

A exposição pré-natal a canabinóides acarreta diferentes respostas entre machos e fêmeas. A síntese de alguns precursores de peptídeos opióides, por exemplo, foi modificada quando o feto foi exposto a canabinóides, e essas respostas foram observadas na fase adulta, sendo que fêmeas apresentaram aumento significativamente maior da síntese desses precursores opióides, em relação aos machos (MANZANARES et al., 1999; PEREZ-ROSADO et al., 2000). Também, fêmeas adultas expostas ao Δ^9 -THC tiveram concentrações plasmáticas do hormônio corticosterona aumentados, diferente dos machos, que, nesse aspecto, não demonstraram alterações (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2004). Todos esses fenômenos envolvendo o sistema endocanabinóide têm sido interpretados como uma indicação potencial do seu envolvimento e importância no desenvolvimento encefálico, sugerindo que exposições a canabinóides em períodos críticos do desenvolvimento podem acarretar alterações permanentes no funcionamento do organismo (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2004; MANZANARES et al., 1999; PEREZ-ROSADO et al., 2000; ROMERO et al., 1997)

O desenvolvimento durante o período pós-natal é resultado da integração entre mecanismos funcionais, estruturais e metabólicos complexos (PATEL; SRINIVASAN, 2010). É sabido que diversos mecanismos fisiológicos não estão completamente desenvolvidos ao nascimento e o processo de maturação continua durante o período pós-natal (PATEL; SRINIVASAN, 2011). Esta fase é caracterizada por uma grande plasticidade do sistema nervoso central com períodos críticos em que qualquer alteração do meio interno pode ser capaz de influenciar tanto positiva como negativamente o crescimento e desenvolvimento (OŠTÁDALOVÁ; BABICKÝ, 2012).

No período perinatal, o encéfalo é exposto a ações hormonais que exercem efeitos organizacionais permanentes sobre a arquitetura neural, que refletirão na fase adulta do indivíduo (DENNIS, 2004; MCCARTHY, 2012). Phoenix e Young (PHOENIX et al., 1959) foram os primeiros a demonstrarem que os hormônios gonadais participavam ativamente no desenvolvimento das características sexualmente dimórficas em mamíferos. Estudos em ratos avaliaram o impacto do dimorfismo sexual na fisiologia reprodutiva e comportamental (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961; GORSKI, 1999) e o período crítico para que essa diferenciação sexual ocorra varia entre as espécies. Em ratos o período crítico vai do 19º dia de gestação até o sétimo dia após o nascimento (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961; HRABOVŠZKY; HUTSON, 2002; WEISZ; WARD, 1980). Além das alterações estruturais, principalmente em núcleos hipotalâmicos, o processo de diferenciação sexual do cérebro determina a concentração de neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina e a expressão de receptores monoaminérgicos no hipotálamo e na Amígdala (GORDON; SHELLENBERGER, 1974; GORSKI, 1999; REZNIKOV; NOSENKO, 1983; SIDDIQUI; GILMORE, 1988). Resultados de nosso laboratório demonstraram que a manipulação do ambiente androgênico durante o período crítico de diferenciação sexual do cérebro ocasiona alterações no desenvolvimento do dimorfismo sexual esquelético (DE MELLO et al., 2012) e, as alterações neuroendócrinas induzidas por este modelo, prejudicam ainda a erupção e mineralização dental, bem como as secreções de leptina e corticosterona após a puberdade (MELLO et al., 2013).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo e está em constante remodelação, que é baseada na interação de células de linhagens precursoras diferentes, como os osteoclastos e os osteoblastos (SIMS; GOOI, 2008). Após a diferenciação e seu recrutamento, os osteoclastos aderem à superfície da matriz óssea, onde secretam ácidos que dissolvem a matriz mineral e enzimas lisossômicas que degradam as proteínas da matriz orgânica, originando uma lacuna de absorção. Na sequência, os osteoblastos secretam nova matriz orgânica (osteóide), que preenche a lacuna de absorção e que é posteriormente mineralizada (MATSUO; IRIE, 2008; NAKAHAMA, 2010; PHAN; XU; ZHENG, 2004). Diversos fatores locais e sistêmicos regulam o processo de remodelação óssea (DRIESSLER; BALDOCK, 2010; TETI, 2011).

Nos seres humanos e outros vertebrados, a estrutura óssea sofre alterações substanciais ao longo da vida. Estas alterações incluem: uma fase de crescimento rápido esquelético acompanhada por acumulação de pico da massa óssea (períodos pré-púbere e púbere); uma fase de estado estacionário no qual a massa óssea permanece constante (adultos-jovens); perda de massa óssea relacionada com a idade (envelhecimento) (LANG, 2011). O tecido ósseo também apresenta um fenótipo dependente do sexo. Recentemente demonstramos que a densidade mineral óssea areal e a força óssea aumentam significativamente com o desenvolvimento em ambos os sexos, entretanto, o crescimento proporciona aos machos um esqueleto maior e não mais denso em relação às fêmeas, e sugere ainda, que as diferenças encontradas na força óssea, seriam determinadas por uma geometria óssea modificada e não pela massa óssea maior (DE MELLO et al., 2012), já que, segundo diversos estudos, a aposição óssea cortical aumentada e a reabsorção óssea endocortical encontrada em machos, proporciona uma distância maior do eixo-longo neutro do fêmur, o que reflete em força óssea aumentada (GILSANZ et al., 1997; KIM et al., 2003; SCHOENAU et al., 2001; TURNER et al., 1989).

Há um número crescente de evidência que sugere que o sistema endocanabinóide desempenha função significativa na formação e remodelação óssea. (BAB, 2007; IDRIS; RALSTON, 2010, 2012; IDRIS et al., 2005). Os receptores canabinóides, CB₁ e CB₂, estão presentes no tecido ósseo, e os

principais endocanabinóide, anandamida e 2-AG, são encontrados nesse tecido, em níveis semelhantes aos encontrados no cérebro, principalmente em núcleos hipotalâmicos (BAB; ZIMMER, 2008). A síntese do 2-AG e a formação óssea também são negativas pela leptina, que sabidamente é um potente inibidor da formação óssea *in vivo* (BAB; ZIMMER, 2008; ELEFTERIOU et al., 2004). É sugerido ainda, que os receptores CB₁ controlam a função osteoblástica pela inibição da síntese de noradrenalina nos terminais dos nervos que estão em contato com essas células. A noradrenalina suprime a formação óssea ao ligar-se a receptores β₂ adrenérgicos, o que é amenizado pela ativação dos receptores CB₁ (BAB, 2007; TAKEDA, 2008). Já a ativação dos receptores CB₂ causa diferentes efeitos em células progenitoras de linhagem osteoblástica, sendo encontrados em células da medula óssea, e em células maduras. Nas células precursoras, a ligação com HU-308, um agonista específico para receptores CB₂, aumentam o *pool* pré-osteoblástico. Em células maduras, o mesmo ligante estimula a diferenciação osteoblástica, a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização da matriz óssea. Recentemente foi demonstrado que o agonista endocanabinóide *Ajulemic acid* também suprime a osteoclastogênese (BAB, 2007; BAB; ZIMMER, 2008).

Embora existam trabalhos demonstrando as respostas do organismo à administração de canabinóides exógenos durante o período pré-natal ou os efeitos mutações específicas em genes que codificam componentes do SEC sobre diversos parâmetros fisiológicos, ainda não foi investigada qual a participação do SEC em parâmetros estruturais no dimorfismo sexual esquelético, assim como os efeitos da inibição dos receptores CB₁ e CB₂ durante o período neonatal sobre o crescimento somático e desenvolvimento ósseo ao longo do desenvolvimento. Além disso, a comunicação entre cérebro e osso no controle desse processo ainda deve ser elucidados.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o impacto do breve bloqueio dos receptores canabinóides CB1 ou CB2 durante o período neonatal sobre o crescimento somático e desenvolvimento do esquelético durante a infância, puberdade e na idade adulta em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar por meio da administração de antagonistas canabinóides específicos (CB1: AM 251 e CB2: SR 144528) a influência da atividade dos receptores CB1 e CB2 durante o período neonatal sobre:

I. Desenvolvimento corporal (avaliado por meio da determinação da massa corporal e as medidas de comprimento e espessura dos fêmures).

II. Propriedades biofísicas e biomecânicas ósseas (avaliadas por meio da avaliação da densidade mineral óssea areal e realização de ensaio mecânico de flexão de fêmures).

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Tratamento

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP-Araçatuba (CEEA - protocolo FOA-01000-2013 – ANEXO 1).

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) recém-nascidos, cedidos pelo Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA-UNESP. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n = 8-10 por grupo), sendo três grupos do sexo masculino e três grupos do sexo feminino, e alojados em grupos de cinco animais por gaiola sob ambiente controlado (temperatura 22±2°C, ciclo de luz 12h/12h com início as 07:00h). Os grupos tratados receberam durante os primeiros sete dias de vida uma dose subcutânea de antagonista dos receptores canabinóides CB₁ (AM251 - CAS n°: 183232-66-8) ou CB₂ (SR144528 - CAS n°: 192703-06-3) - 3 mg / kg dissolvidos em 50 ul de um veículo que consiste em etanol absoluto e tampão fosfato salino – PBS – (DELONG et al., 2010; GRIFFIN et al., 1999; LIU; POPE, 2015; TAO et al., 2015). Os grupos de controle receberam PBS no mesmo volume e período. Os ratos foram desmamados aos 20 dias, e foi, então, fornecida dieta de pellet padrão de rato e água de beber *ad libitum*. O acompanhamento do ciclo estral das ratas foi realizado diariamente através do esfregaço vaginal colhido no período matutino (9h), e analisado à fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de LONG e EVANS (1922), a partir do momento em que foi observado a abertura vaginal até o dia da morte dos animais. Os experimentos foram realizados em 20, 40 e 120 dias pós-natais. No dia do experimento, os ratos foram mortos por overdose de anestesia e fêmures direitos foram obtidos. Os fêmures direitos foram desarticulados e dissecados e armazenados em tubos criogênicos contendo solução fisiológica (NaCl 0.9%) e conservados a -20°C até o momento das análises.

3.2 Parâmetros Avaliados

3.2.1 Biometria

Massa Corporal

Durante o período de estudo, os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento da evolução da massa corporal, bem como da saúde e crescimento dos mesmos.

Medidas do comprimento e da espessura do fêmur direito

As medidas foram realizadas com ajuda de um paquímetro (precisão de 0,05mm) tomando como referência para o comprimento a distância entre a *pars cranialis* do *trochanter major* e o *condylus medialis*. A espessura foi determinada na posição latero-lateral do fêmur tomando-se como referência a base do *trochanter tertius*.

3.2.2 Parâmetros Biofísicos

Aproximadamente doze horas antes do início dos processos de preparação para realização dos ensaios biofísicos, os fêmures foram retirados da temperatura de -20°C e mantidos em geladeira e, duas horas antes, foram mantidos em temperatura ambiente.

Densidade mineral óssea areal

A massa óssea foi analisada pelo método de densitometria mineral óssea areal (BIERING-SORENSEN; BOHR; SCHAADT, 1988; DEMIREL et al., 1998), obtida por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DEXA), modelo Lunar DPX Alpha (Madison – USA), com software especial para pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP. Foram determinados o conteúdo mineral ósseo (g) - CMO, área (cm²) e densidade mineral óssea areal (g/cm²) – DMO areal, medidos em todo o fêmur dos animais.

Ensaio Mecânico

Após a realização do DEXA, os fêmures foram submetidos a um ensaio mecânico, utilizando máquina universal de ensaio, modelo EMIC[®] - DL 3000 (São José dos Pinhais – Brasil), pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp. Para este teste, cada fêmur foi fixo em um aparato que mantinha o mesmo em posição perpendicular, e a célula de carga utilizada de 2000 N à velocidade de 5 mm/min foi aplicada até o momento de fratura do osso. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidas as curvas força-deformação para os diversos ensaios e determinados os parâmetros biofísicos demonstrados na Figura 1.

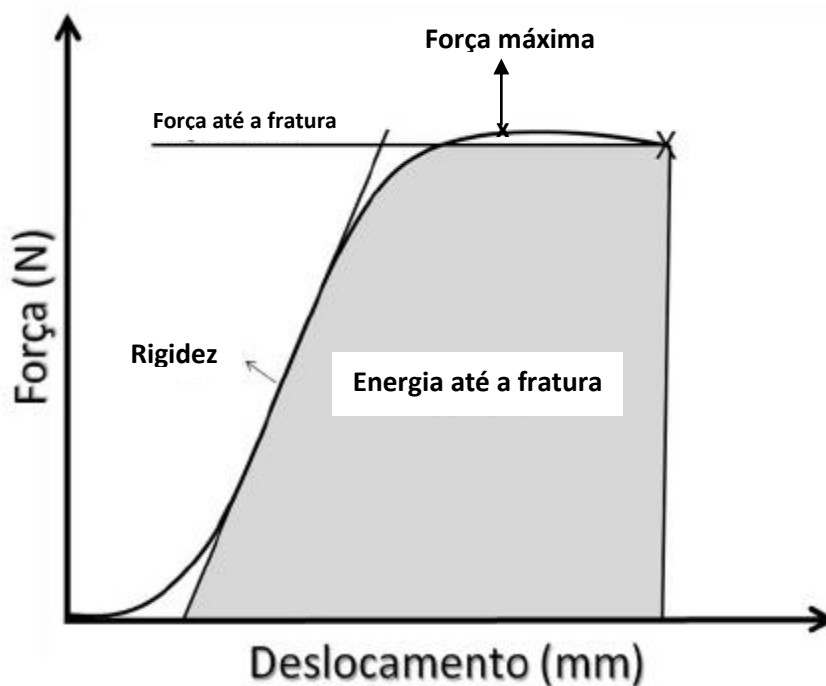


Figura 1 - Modelo de Curva Força-Deslocamento (modificado de TURNER e BURR, 1993).

Onde de acordo com Turner e Burr, (1993):

- Força Máxima (N): Evidencia a maior força aplicada durante o ensaio, seguido da fratura do osso.
- Rigidez (N/mm): Determinada através da inclinação da reta ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica.
- Energia até a fratura (mJ): Corresponde a área sob a curva força-deformação até o ponto de ruptura óssea, obtida por meio de integração numérica.

4.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism (versão 6.0) e expressas em médias±EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (two-way ANOVA test) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas comparações.

5.0 Resultados

5.1 O bloqueio neonatal dos receptores canabinóides CB1 e CB2 promoveu efeito transiente e sexo-dependente sobre a massa corporal e desenvolvimento ósseo ao longo da vida

Não é claro se a inibição dos CB1R (receptor CB1) ou CB2R (receptor CB2) durante o período de diferenciação sexual do cérebro pode interferir com o crescimento somático e se este breve bloqueio pode causar qualquer efeito sobre o dimorfismo sexual esquelético durante o desenvolvimento. Assim, este foi o nosso primeiro objetivo.

Os machos tratados com AM251 e SR144528 exibiram um aumento significativo da massa corporal em comparação aos machos veículo aos 20 e 40 dias de idade (Figura 1, painéis A e B, respectivamente). Em torno da puberdade (40 dias de idade), as fêmeas e veículo e SR144528 tiveram maiores valores de massa corporal que os machos veículo, e o bloqueio neonatal de ambos os receptores canabinóides, ao contrário do que foi observado nos machos, promoveu diminuição da massa corporal das fêmeas tratadas em relação as fêmeas controle. (Figura 1, painel B). Aos 120 dias pós-natais, todos os grupos do sexo de machos mostraram massa corporal significativamente mais elevada do que os grupos femininos. A administração neonatal de AM251 nos machos levou este grupo a apresentar diminuição da massa corporal em comparação aos outros machos (Figura 1, painel C).

Machos veículo e os animais SR144528 de ambos os sexos apresentaram o maior comprimento do fêmur que os outros grupos aos 20 dias de vida (Figura 1, painel D). Já com 40 dias de idade, as fêmeas veículo tiveram os fêmures maiores que os do grupo de machos veículo. Ainda, as fêmeas que foram tratadas com AM251 apresentaram uma diminuição significativa no comprimento femoral em comparação às fêmeas do veículo. Nos machos, o tratamento com ambos os fármacos levou a um aumento no comprimento do fêmur em comparação com os animais veículo do mesmo sexo (Figura 1, painel E). Não houve diferença na espessura femoral nesta idade (Figura 1, painel H).

Na idade adulta (120 dias), todos os grupos do sexo feminino tiveram fêmures mais curtos e mais finos do que os grupos do sexo masculino (Figura 1, painéis F e L, respectivamente), mas ambos os grupos tratados femininos apresentaram um aumento no comprimento do fêmur em comparação com as fêmeas de veículo. Além disso, o tratamento com AM251 em machos também promoveu aumento no comprimento do fêmur em comparação com machos veículo e SR144528, e espessamento femoral nos machos AM251 em relação aos machos SR144528 (Figura 1, painel F).

Os nossos dados mostram que o bloqueio neonatal dos CB1R e CB2R promoveu um efeito transitório e sexo-dependente sobre a massa corporal e o desenvolvimento dos ossos ao longo da vida.

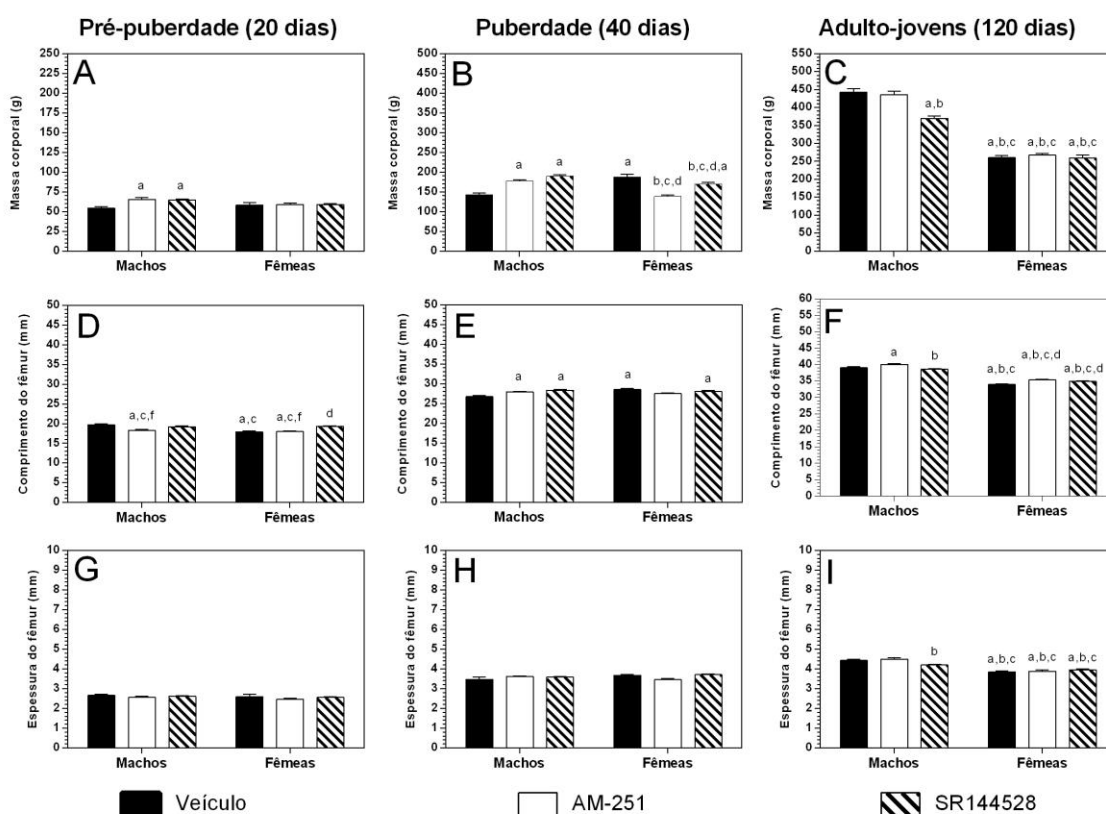


Figura 2. Parâmetros Biométricos – **Painéis A-C: Massa Corporal (g), Painéis D-F: Comprimento (mm) e Painéis G-I: Espessura (mm)**. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 8-10 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos veículo; ^b $p < 0.05$ VS. Machos AM251; ^c $p < 0.05$ VS. Machos SR144528; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas veículo; ^e $p < 0.05$ VS. Fêmeas AM251 e ^f $p < 0.05$ VS. Fêmeas SR144528. (Anexo B).

5.2 A inibição neonatal dos receptores CB1 e CB2 em machos promove um efeito bifásico sobre a aquisição da DMO areal ao longo do desenvolvimento, e aumento da fragilidade óssea nos machos AM251 na idade adulta

Uma vez demonstrado que o breve bloqueio dos receptores canabinóides CB1 ou CB2 causa alterações no desenvolvimento corporal e ósseo, foi decidido, então, analisar se essas mudanças morfológicas nos fêmures foram acompanhadas por alterações nas propriedades materiais e no desempenho mecânico desses ossos.

Para determinação da densidade mineral óssea, foi utilizado um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DEXA), e no período pré-puberdade (20 dias de idade), a administração neonatal de nenhuma das drogas nos machos não resultaram em alteração no parâmetro analisado (Figura 3, painéis A, D e G). Nessa idade, as fêmeas veículo apresentaram menor valor de área total do fêmur dentre todos os grupos, enquanto que as fêmeas AM251 tiveram menor área femoral que os machos veículo e SR144528. Já o tratamento neonatal com SR144528 nas fêmeas promoveu aumento nos valores de área total desses animais em comparação aos outros dois grupos de fêmeas (Figura 3, painel D). Ainda aos 20 dias de vida pós-natais, apenas a administração neonatal de AM251 em fêmeas mostrou efeitos sobre a DMO areal e CMO, uma vez que estas fêmeas apresentaram redução nos valores destes parâmetros em comparação aos machos veículo (Figura 3, painéis A e G).

Na fase púber (40 dias de idade), o tratamento com SR144528, em machos, promoveu um aumento significativo no conteúdo mineral ósseo dos animais, resultando, também, em aumento da densidade mineral óssea areal quando comparado aos machos veículo (Figura 3, painéis B e H). Nessa idade, as fêmeas veículo apresentaram valores mais elevados do que os machos do veículo em todos os parâmetros analisados pelo DEXA, ainda, tiveram os valores de CMO e a DMO areal maiores do que dos machos tratados, e a área total dos fêmures de veículo fêmea foi maior do que a de AM251 machos (Figura 3, painéis B, E e H). Entre as fêmeas, tanto o tratamento com AM251 quanto SR144528 causaram diminuição do CMO em relação com as fêmeas de veículos, mas estes valores ainda foram maiores do que o do grupo de machos veículo. As fêmeas SR144528 apresentaram

maior valor de CMO que os machos AM251 (Figura 3, painel B). O tratamento neonatal com AM251 nas fêmeas levou à redução da área total dos fêmures desses animais quando comparado aos outros dois grupos de fêmeas e aos machos SR144528 (Figura 3, painel E). Ambos os grupos de fêmeas tratadas mostraram menor DMO areal do que os machos veículo e machos AM251 (Figura 3, painel H).

Entre os animais adultos jovens (120 dias), todos os grupos de ratos fêmeas apresentaram menor CMO e área total do fêmur menor do que os grupos do sexo masculino, mas os valores de DMO areal foram menores apenas quando comparado aos valores dos machos veículo (Figura 3, painéis C, F e I). O tratamento, independente da droga (AM251 ou SR144528), foi capaz de promover alterações no CMO nos machos em comparação com os machos de veículos, além disso, os machos AM251 mostraram aumento da área total femoral em relação com os machos de veículos (Figura 3, painéis C e F). Quando analisamos a DMO areal, AM251 e SR144528 machos apresentaram valores mais baixos do que os machos de veículos (Figura 3, painel I).

Nossos resultados sugerem que o bloqueio neonatal dos receptores CB1 e CB2 não interfere no desenvolvimento da aquisição DMO areal em ratos fêmeas. Já no sexo masculino, o tratamento neonatal com SR144528 levou a um aumento deste parâmetro em comparação com os machos de veículos, no entanto, na vida adulta, o bloqueio neonatal tanto com AM251 quanto SR144528, promoveu déficit na aquisição da densidade mineral óssea areal dos animais, resultando em ossos menos densos nos machos tratados em comparação aos ossos dos machos de veículos.

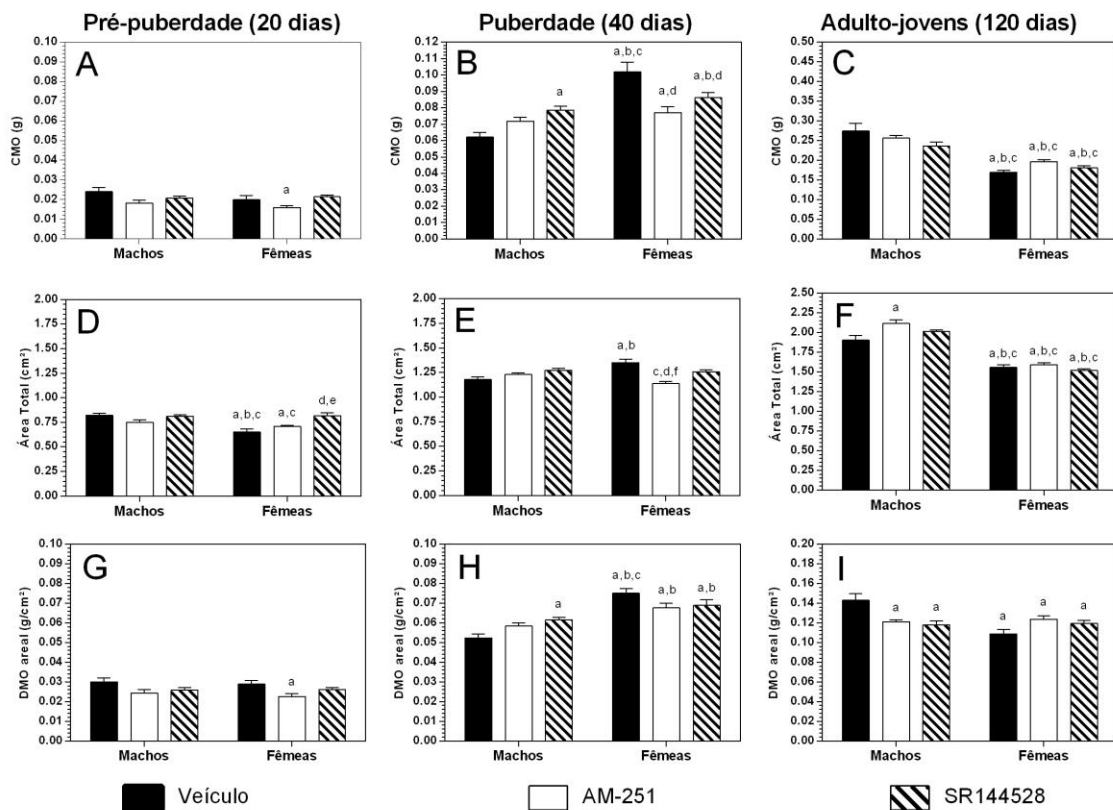


Figura 3. Densidade óssea – Painéis A-C: Conteúdo mineral ósseo (g), Painéis D-F: Área total (cm²) e Painéis G-I: Densidade mineral óssea areal (g/cm²). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 8-10 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ^ap<0.05 VS. Machos veículo; ^bp<0.05 VS. Machos AM251; ^cp<0.05 VS. Machos SR144528; ^dp<0.05 VS. Fêmeas veículo; ^ep<0.05 VS. Fêmeas AM251 e ^fp<0.05 VS. Fêmeas SR144528. (Anexo C).

Devido a forte correlação entre os parâmetros analisados por pelo DEXA com o desempenho mecânico dos ossos e o risco de fratura (CUMMINGS; BATES; BLACK, 2002), os resultados descritos anteriormente levaram-nos a realizar o ensaio de flexão da cabeça do fêmur a fim de avaliar as propriedades biomecânicas dos fêmures de rato, e durante a pré-puberdade, não houve diferenças entre os resultados dos machos e fêmeas veículo em nenhum dos parâmetros avaliados por meio do teste (Figura 4, painéis A, D e G), mas o tratamento com AM251, em ambos os sexos, promoveu redução da resistência femoral a quebra em relação aos machos veículo e SR144528. Assim, o valor de força máxima dos fêmures dos machos AM251 foi menor do que das fêmeas SR144528 (Figura 4, painel A). Os machos tratados com SR144528 mostraram um aumento dos valores de energia

absorvida em comparação com os animais de ambos os sexos tratados com AM251 e com as fêmeas veículo (Figura 4, painel G).

Aos 40 dias pós-natais, ao redor da puberdade, as diferenças sexualmente dimórficas das propriedades biomecânicas ósseas tornam-se evidentes, uma vez que, nesse período, as fêmeas veículo apresentaram maiores valores em todos os parâmetros avaliados pelo teste de flexão da cabeça do fêmur quando comparado aos valores obtidos pelos fêmures dos machos de veículos (Figura 4, painéis B, E e H). Fêmeas veículo apresentaram maior força máxima do que os machos AM251 (Figura 4, painel B). As fêmeas que receberam a administração neonatal de AM251 apresentaram menor valor de força máxima do que as fêmeas de veículo, e os machos veículo apresentaram maior força máxima do que os machos veículo. Ainda, as fêmeas veículo e SR144528 tiveram força máxima dos ossos maior do que dos machos de veículo, as fêmeas AM251 não mostraram essa diferença quando comparado aos machos veículo, mas eles tiveram uma diminuição nos valores deste parâmetros em comparação com as fêmeas veículo (Figura 4, painel B). O tratamento com AM251 no sexo feminino levou a aumento da rigidez comparado as outras fêmeas e aos machos AM251 (Figura 4, painel E), e as fêmeas SR144528 tiveram maior valor de energia do que os machos veículo e as fêmeas AM251. No sexo masculino, animais SR144528 mostraram aumento da força máxima e rigidez em relação aos machos veículo (Figura 4, painéis B e E).

Ao contrário do observado na puberdade, ao atingir a idade adulta, as fêmeas veículo mostraram força máxima menor em comparação aos machos veículo e SR144528. Os grupos AM251 de ambos os sexos mostraram força máxima menor do que os machos de veículos (Figura 4, painel C). O tratamento neonatal com AM251 em machos levou este grupo apresentar o menor valor de rigidez entre todos os outros grupos (Figura 4, painel F). Nessa idade, todos os grupos femininos tiveram menores valores de energia do que os grupos do sexo masculino, e o tratamento, independentemente da droga, promoveu uma diminuição nos valores de energia comparado aos machos de veículo (Figura 4, painel I).

Estes resultados sugerem que o bloqueio neonatal dos receptores CB1 e CB2 promove um efeito bifásico sobre as propriedades biomecânicas do osso ao longo do desenvolvimento e ao redor da puberdade, as respostas a estes bloqueios neonatais mostraram-se sexo-dependentes. Além disso, o tratamento neonatal com

AM251 em machos resultou em um aumento da fragilidade óssea em comparação com os machos de veículo.

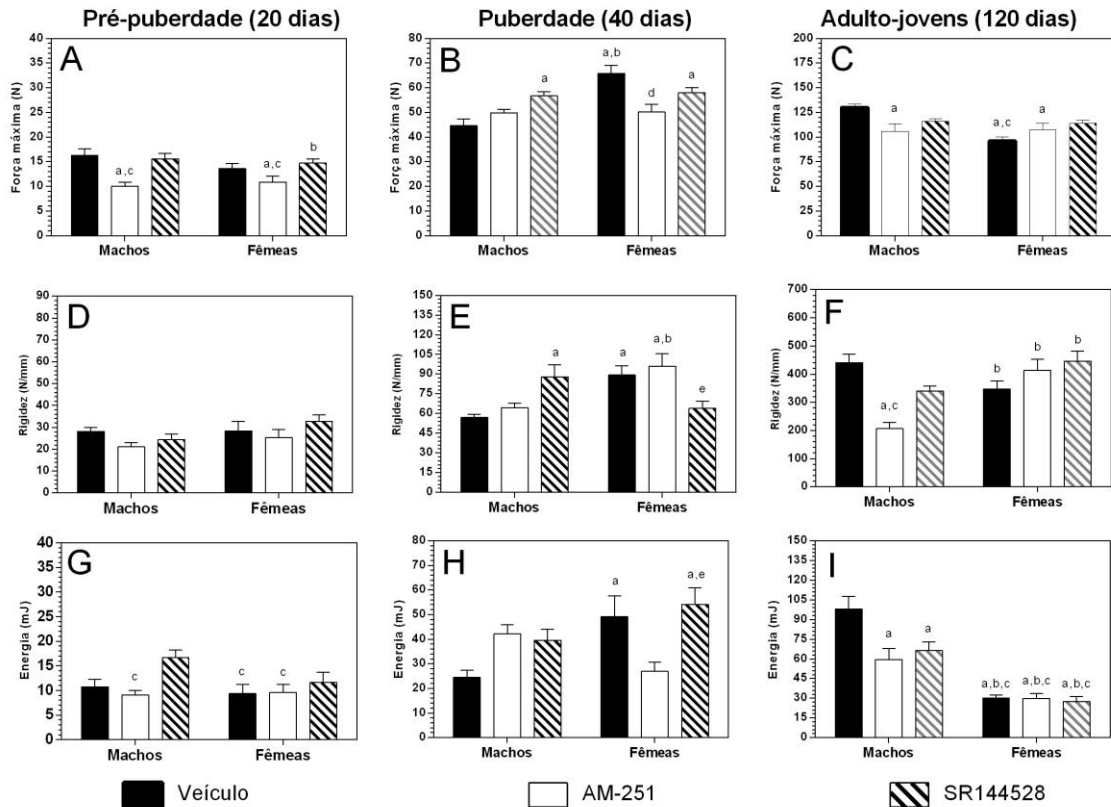


Figura 4. Ensaio mecânico – **Painéis A-C: Força máxima (N), Painéis D-F: Dureza extrínseca (N/mm) e Painéis G-I: Energia ate a fratura (mJ).** Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 8-10 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos veículo; ^b $p < 0.05$ VS. Machos AM251; ^c $p < 0.05$ VS. Machos SR144528; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas veículo; ^e $p < 0.05$ VS. Fêmeas AM251 e ^f $p < 0.05$ VS. Fêmeas SR144528. (Anexo D).

6.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou os efeitos organizacionais a longo prazo da manipulação de componentes do sistema endocanabinóide durante o período neonatal sobre o desenvolvimento corporal e as propriedades biofísicas ósseas em ratos.

Os presentes dados confirmam que, em animais controle, as características sexualmente dimórficas do esqueleto são evidentes a partir da puberdade, uma vez que não houveram diferenças significativas no peso corporal e da espessura do fêmur entre machos e fêmeas veículo no período pré-púbere. Durante a puberdade, as fêmeas apresentaram maior comprimento do fêmur e peso corporal do que os machos, mas não houve diferença na espessura do fêmur, perfil este que se inverte ao atingirem a vida adulta, quando os machos passaram a apresentar valores de comprimento femoral e massa corporal maiores do que das fêmeas veículo.

Antes de atingir a puberdade, os machos e as fêmeas têm um ambiente hormonal semelhante, decorrente da relativa quiescência do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e discreta atividade de fatores de crescimento, o que pode ser um dos fatores responsável por este desenvolvimento semelhante entre os dois sexos (PLANT, 2015; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001).

Nossos resultados mostram que DMO areal e resistência óssea a fraturas aumentam significativamente durante o desenvolvimento em ambos os sexos e este processo de envelhecimento resulta em um esqueleto mais forte, mais volumoso e mais denso nos machos do que nas fêmeas. Estes efeitos dependentes da idade corroboram com a ideia de que o crescimento somático é maior no sexo feminino em algumas fases da puberdade, uma vez que, em geral, as fêmeas têm relativamente o início da puberdade mais cedo do que os machos (PLANT, 2015; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001) e com o conceito clássico da ação estimuladora de andrógenos no ganho de peso e desenvolvimento esquelético masculino (BONJOUR; CHEVALLEY, 2014; TANNER et al., 1976), diferenças estas responsáveis por promover maior resistência óssea nos machos.

É sabido que a exposição pré-natal ao Δ^9 -THC, em animais, provoca redução no crescimento somático da prole (ABEL, 1980; HUTCHINGS et al., 1987; WASSERMAN et al., 2015). E os achados do presente trabalho mostram que o

bloqueio neonatal dos CB1R e CB2R promoveu um efeito transitório e sexo-dependente sobre a massa corporal e o desenvolvimento dos ossos ao longo da vida. Alguns estudos mostram que há uma programação neonatal de mecanismos que controlam o balanço energético ao longo da vida juvenil e na vida adulta (BOURET, 2009; CONTRERAS et al., 2013), e nossos resultados sugerem o envolvimento do sistema endocanabinoide na programação do desenvolvimento deste processo, e ainda, que existe uma resposta sexualmente dimórfica ao tratamento neonatal com o antagonista SR144528, uma vez que apenas a inibição neonatal de receptores CB₂ em machos que promovem efeito persiste até a idade adulta sobre a massa corporal, já que esses animais apresentaram um déficit no ganho de massa corporal em comparação aos machos veículo.

Bab e colaboradores (BAB et al., 2008) mostram que a mutação no gene CNR1 (gene que codifica CB1R) promove uma clara disparidade de gênero no desenvolvimento ósseo em ratos, e os nossos resultados demonstram que breve bloqueio neonatal de receptores CB₁ em ratos também é capaz de acarretar alterações no desenvolvimento ósseo e que estas respostas são sexualmente dimórficas apenas durante a puberdade, uma vez que em animais sexualmente maduros, o tratamento neonatal com AM251 levou ao aumento da massa óssea em animais de ambos os sexos. Curiosamente, o bloqueio neonatal dos CB2R apenas no sexo feminino mostrou efeitos longitudinais sobre o crescimento femoral, já que as fêmeas SR144528 apresentaram maior comprimento do fêmur do que as fêmeas de veículos. Além disso, os nossos resultados sugerem que a aquisição da DMO areal nos machos pode ser afetada pela inibição neonatal dos CB1R e CB2R, e que a qualidade mecânica do fêmur pode ser comprometida pelo tratamento neonatal com AM251, mas apenas os machos são sensíveis a este tratamento. Alguns estudos ainda apontam a existência de um dimorfismo sexual no sistema endocanabinoide, o que pode justificar as respostas sexualmente dimórficas aos tratamentos observadas no presente trabalho, e que esta sensibilidade dependente de gênero já é observada desde os primeiros dias de vida pós-natais (CRAFT; MARUSICH; WILEY, 2013; RUBINO; PAROLARO, 2011).

6.1 CONCLUSÕES

Em suma, os dados do presente estudo demonstraram que o breve bloqueio dos receptores canabinóides CB₁ ou CB₂ no período neonatal promove uma modificação sexo-dependentes e de longa duração sobre o crescimento somático e desenvolvimento esquelético em ratos, e estes resultados fornecem novos insights sobre a complexa dinâmica da homeostase da massa óssea.

5.0 REFERÊNCIAS

- ABEL, E. L. Prenatal exposure to cannabis: a critical review of effects on growth, development, and behavior. **Behavioral and neural biology**, v. 29, n. 2, p. 137–156, jun. 1980.
- ALGER, B. E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. **Progress in neurobiology**, v. 68, n. 4, p. 247–286, nov. 2002.
- BAB, I. et al. Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20 Suppl 1, n. 7, p. 69–74, 2008.
- BAB, I. A. Regulation of skeletal remodeling by the endocannabinoid system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1116, p. 414–422, 2007.
- BAB, I.; ZIMMER, A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 182–188, 2008.
- BARRACLOUGH, C. A.; GORSKI, R. A. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. **Endocrinology**, v. 68, p. 68–79, jan. 1961.
- BERRENDERO, F. et al. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 33, n. 3, p. 181–191, set. 1999.
- BIERING-SORENSEN, F.; BOHR, H.; SCHAADT, O. Bone mineral content of the lumbar spine and lower extremities years after spinal cord lesion. **Paraplegia**, v. 26, n. 5, p. 293–301, out. 1988.
- BONJOUR, J.-P.; CHEVALLEY, T. Pubertal Timing, Bone Acquisition, and Risk of Fracture Throughout Life. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 5, p. 820–847, 2014.
- BOURET, S. G. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 48 Suppl 1, n. 7, p. S31–S38, 2009.
- CASTILLO, P. E. et al. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70–81, 2012.
- CONTRERAS, C. et al. Effects of neonatal programming on hypothalamic mechanisms controlling energy balance. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 45, n. 13, p. 935–944, dez. 2013.

CRAFT, R. M.; MARUSICH, J. A.; WILEY, J. L. Sex differences in cannabinoid pharmacology: A reflection of differences in the endocannabinoid system? **Life Sciences**, v. 92, n. 8-9, p. 476–481, 2013.

CUMMINGS, S. R.; BATES, D.; BLACK, D. M. Clinical use of bone densitometry: scientific review. **JAMA**, v. 288, n. 15, p. 1889–1897, out. 2002.

DE MELLO, W. G. et al. Effects of neonatal castration and androgenization on sexual dimorphism in bone, leptin and corticosterone secretion. **Bone**, v. 50, n. 4, p. 893–900, 2012.

DELONG, G. T. et al. Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. **Drug and alcohol dependence**, v. 112, n. 1-2, p. 126–133, nov. 2010.

DEMIREL, G. et al. Osteoporosis after spinal cord injury. **Spinal cord**, v. 36, n. 12, p. 822–825, dez. 1998.

DENNIS, C. **Brain development: the most important sexual organ.** *Nature* England, jan. 2004.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, dez. 1992.

DINH, T. P. et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10819–10824, ago. 2002.

DRIESSLER, F.; BALDOCK, P. A. Hypothalamic regulation of bone. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 45, n. 4, p. 175–181, 2010.

ELEFTERIOU, F. et al. Serum leptin level is a regulator of bone mass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 3258–3263, mar. 2004.

ELPHICK, M. R.; EGERTOVA, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 356, n. 1407, p. 381–408, mar. 2001.

FATTORE, L.; FRATTA, W. How important are sex differences in cannabinoid action. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 544–548, 2010.

FERNANDEZ-RUIZ, J. et al. Cannabinoids and gene expression during brain development. **Neurotox Res**, v. 6, n. 5, p. 389–401, 2004.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical ...**, v. 86, p. 1646–1647, 1964.

GIANG, D. K.; CRAVATT, B. F. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2238–2242, mar. 1997.

GILSANZ, V. et al. Differential effect of gender on the sizes of the bones in the axial and appendicular skeletons. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 5, p. 1603–1607, maio 1997.

GODOY-MATOS, A. F. DE et al. **O sistema endocanabinóide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia scielo* , , 2006.

GONG, J. P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.

GORDON, J. H.; SHELLENBERGER, K. Regional catecholamine content in the rat brain: sex differences and correlation with motor activity. **Neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 129–137, fev. 1974.

GORSKI, R. A. Development of the cerebral cortex: XV. Sexual differentiation of the central nervous system. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 3, p. 344–346, 1999.

GRIFFIN, G. et al. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: Further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 377, n. 1, p. 117–125, 1999.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 127–137, abr. 2007.

HERKENHAM, M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 5, p. 1932–6, 1990.

HERNANDEZ, M. et al. Cannabinoid CB(1) receptors colocalize with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. **Brain research**, v. 857, n. 1-2, p. 56–65, fev. 2000.

HRABOVSKY, Z.; HUTSON, J. M. Androgen imprinting of the brain in animal models and humans with intersex disorders: review and recommendations. **The Journal of urology**, v. 168, n. 5, p. 2142–2148, nov. 2002.

HUTCHINGS, D. E. et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol during pregnancy in the rat: I. Differential effects on maternal nutrition, embryotoxicity, and growth in the offspring. **Neurotoxicology and teratology**, v. 9, n. 1, p. 39–43, 1987.

IDRIS, A. I. et al. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. **Nature medicine**, v. 11, n. 7, p. 774–779, jul. 2005.

IDRIS, A. I.; RALSTON, S. H. Cannabinoids and bone: Friend or foe? **Calcified Tissue International**, v. 87, n. 4, p. 285–297, 2010.

IDRIS, A. I.; RALSTON, S. H. Role of cannabinoids in the regulation of bone remodeling. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. NOV, p. 1–8, 2012.

KANO, M. Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 90, n. 7, p. 235–250, 2014.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 529–558, 2012.

KIM, B.-T. et al. The structural and hormonal basis of sex differences in peak appendicular bone strength in rats. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 1, p. 150–155, jan. 2003.

LANG, T. F. The bone-muscle relationship in men and women. **Journal of osteoporosis**, v. 2011, p. 702735, 2011.

LIU, J.; POPE, C. The cannabinoid receptor antagonist AM251 increases paraoxon and chlorpyrifos oxon toxicity in rats. **Neurotoxicology**, v. 46, p. 12–18, jan. 2015.

MACKIE, K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. **International journal of obesity (2005)**, v. 30 Suppl 1, p. S19–23, abr. 2006.

MANZANARES, J. et al. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. **Trends in pharmacological sciences**, v. 20, n. 7, p. 287–294, jul. 1999.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, ago. 1990.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 201–209, 2008.

MCCARTHY, M. M. **Sexual differentiation of brain and behavior**. [s.l.] Elsevier Inc., 2012.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MELLO WG, DE MORAIS SRL, DORNELLES RCM, KAGOHARA ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J, B. DE C. J. Neonatal neuroendocrine alterations impair tooth eruption, enamel mineralization, and leptin and corticosterone secretion in adulthood. **Bone Abstracts**, v. 1, n. May, p. 80–81, 2013.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, set. 1993.

NAKAHAMA, K. I. Cellular communications in bone homeostasis and repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 4001–4009, 2010.

ONAIVI, E. S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1074, p. 514–536, 2006.

OŠTÁDALOVÁ, I.; BABICKÝ, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. **Physiological Research**, v. 61, n. SUPPL. 1, 2012.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 3, p. 658–661, mar. 2010.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 58 Suppl 2, p. 18–28, 2011.

PEREZ-ROSADO, A. et al. Prenatal Delta(9)-tetrahydrocannabinol exposure modifies proenkephalin gene expression in the fetal rat brain: sex-dependent differences. **Brain research. Developmental brain research**, v. 120, n. 1, p. 77–81, mar. 2000.

PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 66, n. 2-3, p. 101–121, 2002.

PHAN, T. C. A; XU, J.; ZHENG, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: Impact in bone disease. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 4, p. 1325–1344, 2004.

PHOENIX, C. H. et al. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, p. 369–382, set. 1959.

PLANT, T. M. **Neuroendocrine control of the onset of puberty.** *Frontiers in neuroendocrinology*, jul. 2015.

REZNIKOV, A. G.; NOSENKO, N. D. It is possible that noradrenaline is the biogenic monoamine responsible for androgen-dependent sexual brain differentiation. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 81, n. 1, p. 91–93, jan. 1983.

ROMERO, J. et al. Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 26, n. 3, p. 317–323, 1997.

RUBINO, T.; PAROLARO, D. Sexually dimorphic effects of cannabinoid compounds on emotion and cognition. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 5, p. 64, 2011.

RUGINSK, S. G. et al. The endocannabinoid system and the neuroendocrine control of hydromineral balance. **Journal of neuroendocrinology**, v. 26, n. 6, p. 370–376, jun. 2014.

SAGAN, S. et al. Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. **The European journal of neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 691–699, fev. 1999.

SCHOENAU, E. et al. The development of bone strength at the proximal radius during childhood and adolescence. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 2, p. 613–618, fev. 2001.

SIDDIQUI, A.; GILMORE, D. P. Regional differences in the catecholamine content of the rat brain: effects of neonatal castration and androgenization. **Acta endocrinologica**, v. 118, n. 4, p. 483–494, ago. 1988.

SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 444–451, 2008.

SVIZENSKA, I.; DUBOVY, P.; SULCOVA, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 90, n. 4, p. 501–511, out. 2008.

TAKEDA, S. Central control of bone remodelling. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 802–807, 2008.

TANNER, J. M. et al. Relative importance of growth hormone and sex steroids for the growth at puberty of trunk length, limb length, and muscle width in growth hormone-deficient children. **The Journal of pediatrics**, v. 89, n. 6, p. 1000–1008, dez. 1976.

TAO, Y. et al. Cannabinoid CB2 receptor stimulation attenuates brain edema and neurological deficits in a germinal matrix hemorrhage rat model. **Brain research**, v. 1602, p. 127–135, mar. 2015.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 1, p. 111–151, fev. 2001.

TETI, A. Bone development: Overview of bone cells and signaling. **Current Osteoporosis Reports**, v. 9, n. 4, p. 264–273, 2011.

TSOU, K. et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393–411, 1997.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

TURNER, R. T. et al. Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 4, p. 557–563, ago. 1989.

WASSERMAN, E. et al. CB1 cannabinoid receptors mediate endochondral skeletal growth attenuation by Delta9-tetrahydrocannabinol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1335, p. 110–119, jan. 2015.

WEISZ, J.; WARD, I. L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. **Endocrinology**, v. 106, n. 1, p. 306–316, jan. 1980.

ANEXOS

A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FOA/UNESP).




Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Influência do sistema endocanabinóide durante o período neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético” sob responsabilidade do Pesquisador **JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO** e colaboração de Noéle Egídia Watanabe Kill e Wagner Garcez de Mello está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-01000-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research “Endocannabinoid system influence during the neonatal period on skeletal sexual dimorphism”, process number FOA-01000-2013, under responsibility of **JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO** and with collaboration of Noéle Egídia Watanabe Kill and Wagner Garcez de Mello agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça
Tel (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: eervolino@foa.unesp.br

B – Tabela 1 – Parâmetros biométricos

Idade	Parâmetro	Grupos experimentais					
		Machos veiculo	Machos AM-251	Machos SR144528	Fêmeas veiculo	Fêmeas AM-251	Fêmeas SR144528
20 dias	Massa Corporal (g)	54.20±2.04	65.60±2.50 ^a	64.70±0.98 ^a	56.66±3.09	56.30±2.33 ^b	58.80±1.43
	Comprimento do fêmur (mm)	19.72±0.2705	18.34±0.2105 ^{a,c,f}	19.24±0.2074	17.70±0.2504 ^{a,c}	18.08±0.2035 ^{a,c,f}	19.22±0.1511 ^d
	Espessura (mm)	2.66±0.0500	2.56±0.0499	2.62±0.0216	2.3011±0.3144	2.47±0.0471	2.56±0.0301
40 dias	Massa Corporal (g)	143.20±3.68	177.90±2.52 ^a	189.80±3.64 ^a	187.71±6.99 ^a	138.66±3.74 ^{b,c,d}	169.70±3.81 ^{b,c,d,a}
	Comprimento do fêmur (mm)	26.72±0.3314	27.89±0.1526 ^a	28.35±0.1919 ^a	28.50±0.2732 ^a	27.53±0.1656	28.09±0.1644 ^a
	Espessura (mm)	3.48±0.1104	3.61±0.0353	3.58±0.0381	3.67±0.0519	3.46±0.0495 ^f	3.71±0.0411
120 dias	Massa Corporal (g)	442.62 ±9.77	435.60±9.13	369.80±6.29 ^{a,b}	260.10±6.44 ^{a,b,c}	267.50±4.37 ^{a,b,c}	258.50±8.49 ^{a,b,c}
	Comprimento do fêmur (mm)	39.01±0.3460	40.06±0.2386a	38.55±0.2013 ^b	33.96±0.2150 ^{a,b,c}	35.37±0.1766 ^{a,b,c,d}	34.96±0.1794 ^{a,b,c,d}
	Espessura (mm)	4.43±0.0576	4.50±0.0734	4.20±0.0444 ^b	3.85±0.0445 ^{a,b,c}	3.89±0.0609 ^{a,b,c}	3.95±0.0465 ^{a,b,c}

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 8-10 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ap<0.05 VS. Machos veiculo; bp<0.05 VS. Machos AM251; cp<0.05 VS. Fêmeas SR144528; dp<0.05 VS. Fêmeas veiculo; ep<0.05 VS. Fêmeas AM251 e fp<0.05 VS. Fêmeas SR144528.

C – Tabela 2 – Densidade óssea

Idade	Parâmetro	Grupos experimentais					
		Machos veículo	Machos AM-251	Machos SR144528	Fêmeas veículo	Fêmeas AM-251	Fêmeas SR144528
20 dias	Área total (cm ²)	0.821±0.0223	0.751±0.025	0.811±0.016	0.653±0.030 ^{a,b,c}	0.710±0.010 ^{a,c}	0.819±0.027 ^{d,e}
	Conteúdo mineral ósseo (CMO) (g)	0.025±0.002	0.018±0.001	0.0208±0.001	0.019±0.002	0.016±0.001 ^a	0.021±0.001
	Densidade mineral óssea areal (DMO areal) (g/cm ²)	0.030±0.002	0.024±0.001	0.025±0.001	0.028±0.001	0.022±0.001 ^a	0.026±0.001
40 dias	Área total (cm ²)	1.179±0.027	1.230±0.015	1.272±0.018	1.351±0.036 ^{a,b}	1.137±0.021 ^{c,d,f}	1.255±0.021
	Conteúdo mineral ósseo (CMO) (g)	0.062±0.002	0.071±0.002	0.078±0.002 ^a	0.101±0.005 ^{a,b,c}	0.077±0.003 ^{a,d}	0.086±0.003 ^{a,b,d}
	Densidade mineral óssea areal (DMO areal) (g/cm ²)	0.052±0.001 ^{c,d,e,f}	0.058±0.001 ^{d,e,f}	0.061±0.001 ^d	0.075±0.002	0.067±0.002	0.068±0.002
120 dias	Área total (cm ²)	1.903±0.062 ^b	2.116±0.043	2.010±0.018	1.555±0.035 ^{a,b,c}	1.591±0.023 ^{a,b,c}	1.520±0.017 ^{a,b,c}
	Conteúdo mineral ósseo (CMO) (g)	0.273±0.019	0.256±0.006	0.236±0.009	0.169±0.004 ^{a,b,c}	0.195±0.005 ^{a,b,c}	0.181±0.004 ^{a,b,c}
	Densidade mineral óssea areal (DMO areal) (g/cm ²)	0.143±0.006	0.121±0.001	0.117±0.003 ^a	0.109±0.004 ^{a,b,c}	0.123±0.003 ^{a,b}	0.119±0.003 ^{a,b}

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 8-10 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ap<0.05 V.S. Machos veículo; bp<0.05 V.S. Machos AM251; cp<0.05 V.S. Machos SR144528; dp<0.05 V.S. Fêmeas veículo; ep<0.05 V.S. Fêmeas AM251 e fp<0.05 V.S. Fêmeas SR144528.

D – Tabela 3 – Ensaio mecânico

Grupos experimentais

Idade	Parâmetro	Machos veículo	Machos AM-251	Machos SR144528	Fêmeas veículo	Fêmeas AM-251	Fêmeas SR144528
20 dias	Força máxima (N)	16.28±1.37	10.03±0.82 ^{a,c}	15.62±1.01	13.63±1.06	10.89±1.15 ^{a,c}	14.79±0.82 ^b
	Rigidez (N/mm)	28.16±1.74	21.08±1.95	24.30±2.62	28.40±4.32	25.33±3.80	32.80±2.87
	Energia até a fratura (mJ)	10.75±1.53	9.06±0.97 ^c	16.72±1.53	9.34±1.86 ^c	9.56±1.66 ^c	11.60±2.06
40 dias	Força máxima (N)	44.63±2.70 ^c	49.78±1.47	56.78±1.68 ^a	64.58±3.11 ^{a,b}	50.20±3.14 ^d	58.09±1.99 ^a
	Rigidez (N/mm)	56.97±2.29	64.34±3.61	88.11±8.92 ^a	89.26±7.35 ^a	96.17±9.68 ^{a,b}	64.05±5.51 ^e
	Energia até a fratura (mJ)	24.41±3.02	42.23±3.64	39.65±4.30	49.10±8.50 ^a	26.88±3.81	54.12±6.71 ^{a,e}
120 dias	Força máxima (N)	130.05±3.35	105.92±7.42 ^a	116.22±2.60	96.17±3.72 ^{a,c}	107.53±6.20 ^a	114.20±2.68
	Rigidez (N/mm)	440.64±30.18	207.01±21.06 ^{a,c}	340.17 ±17.94	347.35±29.16 ^b	412.54±39.61 ^b	446.48±34.56 ^b
	Energia até a fratura (mJ)	98.24±9.61	59.53±8.26 ^a	66.46±6.42 ^a	30.10±2.53 ^{a,b,c}	29.92±3.57 ^{a,b,c}	27.62±3.59 ^{a,b,c}

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 8-10 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ap<0.05 VS. Machos veículo; bp<0.05 VS. Machos AM251; cp<0.05 VS. Machos SR144528; dp<0.05 VS. Fêmeas veículo; ep<0.05 VS. Fêmeas AM251 e fp<0.05 VS. Fêmeas SR144528.