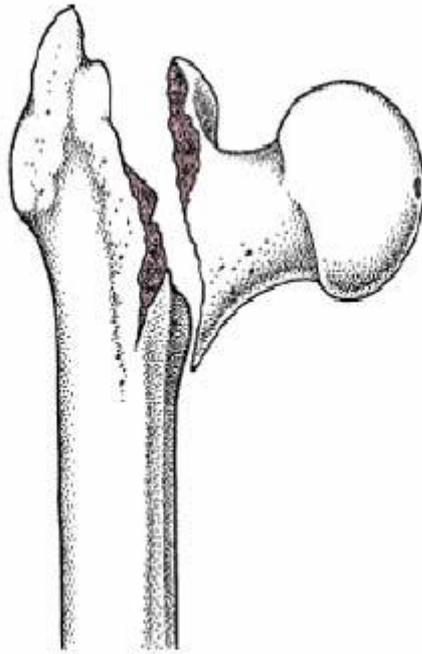


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA



NATHÁLIA TUANY DUARTE

***ANÁLISES BIOQUÍMICAS E BIOMECÂNICAS DO METABOLISMO ÓSSEO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS***

ARAÇATUBA

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NATHÁLIA TUANY DUARTE

***ANÁLISES BIOQUÍMICAS E BIOMECÂNICAS DO METABOLISMO ÓSSEO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS***

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NATHÁLIA TUANY DUARTE

***ANÁLISES BIOQUÍMICAS E BIOMECÂNICAS DO METABOLISMO ÓSSEO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS***

Aprovado em: 30/09/2010

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rita Cássia M. Dornelles
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP
Presidente

Prof. Dr. João César Bedran de Castro
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP
Membro Titular

Prof. Dr. Mário Jefferson Q. Louzada
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP
Membro Titular

DEDICATÓRIA

À Lucimara dos Santos Silva, minha mãe, por ser muito mais do que minha genitora, por ser minha amiga, minha confidente, por me ensinar que a perseverança e a vontade de vencer são virtudes que brotam de nossa fé nos momentos mais difíceis de nossas vidas, e que essas virtudes somadas ao amor que sentimos pelas pessoas que realmente são importantes para nós, nos dá a força necessária para triunfar em qualquer luta.

Ao meu pai, Silvio Duarte, por me apoiar e suportar as minhas decisões, pelos conselhos e o amparo que sempre me deu, por todas as horas de trabalho, muitas vezes exaustivas, a que ele se dedicou, e ainda se dedica, para manter a nossa família, nosso lar, e para que se tornasse possível a conclusão do meu curso.

À minha tia, Luzinete dos Santos Silva, por estar presente em todos os momentos da minha vida, sendo minha luz guia nos momentos mais difíceis pelos quais passei, e uma das pessoas com a qual sempre compartilhei minhas alegrias, por me ensinar que viver é muito mais do que simplesmente existir, é equilibrar nossa vida lutando pelos nossos objetivos e sabendo doar aos outros o que temos de melhor em nós.

Aos meus irmãos, Caio Gabriel Duarte e Julia Lauany Duarte, que foram minha fonte de fé, luta e perseverança para não desistir do meu objetivo principal durante esses quatro anos que foi me graduar, eles sempre foram e serão minha determinação e o motivo pelo qual eu busco não falhar em minhas empreitadas, pois sei que minhas ações serão o reflexo das deles no futuro, sem eles não seria capaz de seguir essa estrada até o fim, as vezes tropeçando nas pedras, mas não me deixando ser corrompida pelas pessoas, não me esquecendo dos meus princípios, e nunca me desviando do caminho certo perante os meus conceitos. Amo vocês, obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, força que criaste tudo que existe, por confiar um propósito em minha vida, que é o de levar saúde e bem estar através da minha profissão para aqueles que necessitarem do meu serviço. Agradeço em segundo plano, mas não com menos importância, às correntes espirituais nas quais acredito, por ser o intermédio entre Deus e eu, e por me iluminarem, me dando a força, a paz e a tranquilidade necessária para alcançar esse propósito.

À professora Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles, pela atenção, apoio e paciência durante esses anos de trabalho no projeto de iniciação científica que originou o trabalho de conclusão de curso, pelas broncas dadas quando necessário e pelos elogios cedidos quando merecidos, por muitas vezes ter sido aquela com a qual compartilhávamos nossas alegrias e angústias no decorrer do curso de odontologia.

Aos meus amigos Lucas Perez Lahr, por ter participado diretamente do projeto de iniciação científica, e Robert Florêncio Bueno, por ter participado indiretamente nos aconselhando e ajudando na apresentação do projeto nos congressos que participamos, por terem sido meus verdadeiros companheiros durante esses anos de faculdade, me ajudando e me aconselhando em todos os problemas pelos quais passei, e compartilhando todas as alegrias. Pelas noites mal dormidas, fossem elas por motivos de estudo, ou para que nos sentíssemos mais acolhidos um pelos outros, tentando esquecer a ausência de nossos respectivos familiares, pois laços fortes e sinceros foram criados entre nós, a ponto de formarmos nossa “grande” pequena família.

À Lyvia Fernandes Prates, pelos momentos de estudo que compartilhamos e no laboratório de fisiologia, em prol da conclusão do nosso projeto de iniciação científica.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) e todos os seus funcionários, que tornaram possível e agradável a minha estada na faculdade, bem como o meu desenvolvimento intelectual, pessoal e profissional.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.” **Johann Wolfgang Von Goethe**

RESUMO

DUARTE, N.T.; DORNELLES, R.C.M.; **Análises Bioquímicas e Biomecânicas do Metabolismo Ósseo de Ratas Ovariectomizadas**. (Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS E BIOMECÂNICAS DO METABOLISMO ÓSSEO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

RESUMO

O estrogênio desempenha importante atuação em tecido reprodutivo e não-reprodutivo, que influencia o crescimento na puberdade, regula a maturação óssea e mantém a massa óssea em mulheres e nos homens após a puberdade. Na menopausa o estrogênio está associado com várias doenças que incluem a reabsorção óssea. A reposição hormonal sem causar danos maiores ao organismo é objetivo da prática médica. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito dose-resposta de estrogênio no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. Neste estudo foram utilizadas ratas Wistar (6 meses) intactas e ovariectomizadas (OVX). Após 15 dias da OVX foram inseridos pellets contendo óleo de milho ou estradiol com 100, 200 ou 300 μg de 17β -estradiol, durante 60 dias. Após este período, e sob anestesia (xylazina-4mg/kg; ketamina-40mg/Kg), o sangue foi coletado da veia jugular e em seguida os animais foram sacrificados pelo excesso de anestésico para a remoção dos fêmures. O sangue foi centrifugado e o plasma armazenado em freezer para determinações bioquímicas posteriores de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Os fêmures foram analisados mecanicamente em ensaio de flexão de três pontos (diáfise) e compressão axial (côndilo). Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa na análise do terço médio dos grupos experimentais. O teste de compressão da cabeça do fêmur demonstrou que o grupo tratado com 100 μg de estradiol apresentou maior resistência à compressão que o grupo tratado com 200 μg de estradiol. A concentração plasmática de cálcio foi semelhante entre os grupos, porém o fósforo foi significativamente menor no grupo de animais OVX

tratados com 100 μg de estradiol e a fosfatase alcalina nos animais que receberam 200 μg de estradiol. Estes resultados evidenciam que a concentração de 100 μg de estradiol, administrada em ratas após a estropausa, desencadeia efeitos significativos em estruturas ósseas, principalmente no osso trabecular.

PALAVRAS CHAVE: estrógeno; biomecânica óssea; metabolismo ósseo

DUARTE, N.T.; DORNELLES, R.C.M.; **Analysis Biochemical and Biomechanical Bone Metabolismo of Ovariectomized Rats.** (Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

BIOCHEMICAL AND BIOMECHANICAL ANALYSIS OF THE METABOLISM OF OVARIECTOMIZED RATS

ABSTRACT

Estrogen plays an important role in both reproductive and non-reproductive tissues; it influences pubertal growth, regulates bone maturation, and maintains bone mass in women and in men after puberty. In menopausal women the estrogen is associated with various diseases, which include bone resorption. Today, medicine is the attempt to make the hormone replacement, but without causing further damage to the body. The goal of the present study was to systematically to define the dose–response effect of estrogen on bone of ovariectomized rats. This study used Wistar rats (6 months) intact and ovariectomized (OVX). After 15 days of OVX, were inserted pellets containing corn oil or estradiol with 100, 200 or 300 μg of 17β - estradiol, during 60 days. After this period and under anesthesia (xylazine-4mg/kg; ketamine-40mg/Kg), blood was collected of jugular vein and then, the animals were sacrificed by the excess of anesthetic for removal of the femurs. The blood was centrifuged and plasma stored in a freezer for subsequent biochemical determination of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase. The femurs were analyzed mechanically bending three-point (shaft) and axial compression applies to the condyle. The results showed no statistically significant difference in the analysis of the middle third of the experimental groups. The compression test of the femoral head showed that the group treated with 100 μg of estradiol had a higher compressive strength than the group treated with 200 μg of estradiol. The plasma concentration of calcium was similar between groups, but the phosphorus was significantly lower in the OVX group treated with 100 μg of estradiol and alkaline phosphatase in animals that received

200 μg of estradiol. These results show that the concentration of 100 μg of estradiol administered to female rats after estropausa triggers significant effects on bone structures, mainly in trabecular bone.

KEY WORDS: estrogen, bone biomechanics, bone metabolism

SUMÁRIO

1. <i>Introdução</i>	11
2. <i>Proposição</i>	13
3. <i>Materiais e métodos</i>	14
4. <i>Resultados</i>	20
5. <i>Discussão</i>	24
6. <i>Conclusão</i>	27
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	28

INTRODUÇÃO

O osso é formado por matéria orgânica (células especializadas, colágeno e substância amorfa) que acolhe os elementos minerais como cálcio e fósforo, cuja presença confere a dureza característica ao osso. Ele é constituído por dois setores com características distintas: uma é mais compacta (osso cortical) e a outra esponjosa (osso trabecular) e está em constante processo de reabsorção e formação (Hill *et al.*,1998)

A remodelação óssea é processo de aposição no qual há remoção localizada do osso antigo e substituição por osso recentemente formado, de maneira que a reabsorção corresponda à formação óssea com o intuito de manter o equilíbrio entre esses processos, equilíbrio esse que se encontrará afetado perante a deficiência estrogênica (Hill *et al.*,1998). Estímulos hormonais e físicos recrutam células precursoras de osteoclastos, as quais estão presentes em tecidos hematopoiéticos, como a medula óssea. Essas células fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados, os quais são responsáveis pela reabsorção óssea e posterior estimulação da proliferação de osteoblastos, esses últimos irão sintetizar a matriz osteóide que irá se mineralizar, reconstituindo o osso e finalizando o processo da remodelação (Boyde *et al.*,1984).

O estrógeno, produzido principalmente pelos ovários e sendo o estradiol seu principal produto secretório, possui receptores em diversos tecidos como no sistema nervoso central, útero, ovário, coração, sangue, glândula mamária, intestino e no osso onde influencia o crescimento, a diferenciação e a função desses tecidos, evidenciando sua importância no crescimento ósseo bem como na manutenção do pico de massa óssea (Amadei *et al.*,2006). Tanto homens como mulheres começam a perder massa óssea aos 40 anos aproximadamente. No entanto, mulheres experimentam fase rápida de perdas durante os primeiros 5 a 10 anos pós menopausa, devido à perda de estrógeno (Manolagas *et al.*, 2000). A diminuição da secreção de estrógeno é fator determinante na diminuição da massa óssea associado à menopausa devido à maior atividade metabólica óssea, causando transtorno no processo normal de remodelação, alterando a micro arquitetura dos ossos, inclusive os da face (Amadei *et al.*, 2006). A falta desse hormônio em mulheres menopausadas faz com que receptores de estrógeno que agem na reabsorção óssea, respondam à escassez de estrógeno aumentando sua atividade, e receptores que agem na formação óssea respondam diminuindo a sua atividade,

podendo desencadear a osteoporose (Kanis, 1996). Este fato pode ser explicado a partir de estudos em ratos, que demonstraram ser a perda de esteróides sexuais, como o estrógeno, a causa para aumento na produção e ação de citocinas que são responsáveis pela osteoclastogênese e osteoblastogênese, com posterior prorrogação na duração do trabalho dos osteoclastos e redução na duração do trabalho dos osteoblastos, estabelecendo desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea (Manolagas *et al.*, 1995; 2000). Estudos também demonstraram que o reparo ósseo após exodontia em ratas OVX, foi influenciado por estimulação no processo de reabsorção óssea decorrente da ovariectomia (Shimizu *et al.*, 1998). As ratas foram utilizadas como modelo para esse estudo pelo fato de poderem alcançar naturalmente o fenótipo esquelético decorrente da ovariectomia associada ou não a presença de estrógeno, bem como pela sua organização óssea que possibilita a realização de testes biomecânicos e a mensuração de proteínas e mineral.

Os avanços nas pesquisas relacionadas ao tecido ósseo e seu metabolismo, especialmente a remodelação óssea, se direcionam para melhor compreensão de um dos problemas públicos de saúde que atinge uma em cada quatro mulheres na menopausa, a osteoporose (Amadei *et al.*, 2006). A influência da deficiência estrogênica em tais mulheres, associada a modificações na remodelação óssea, apresenta alterações nos ossos da face e na cavidade bucal, aumentando os riscos de perda dentária. Um estudo recente estimou as conseqüências mecânicas da perda de estrogênio após menopausa e suplementação de estrógeno, simulando testes biomecânicos e utilizando tomografia computadorizada para analisar o osso (tíbia e rádio), e demonstrou que, em curto prazo, as alterações de remodelação que ocorrem após a menopausa, não afetam somente o osso trabecular, que se remodela rápido, mas também o osso cortical, e que a suplementação estrogênica não apenas preserva, mas na verdade melhora a competência mecânica do osso (Wehrli *et al.*, 2010). Essas pesquisas buscam estabelecer terapia preventiva e eficaz que possa auxiliar a população, promovendo saúde.

PROPOSIÇÃO

1. Verificar a atuação de diferentes concentrações de estradiol sobre a resistência óssea dos fêmures de ratas intactas e OVX.
2. Analisar o metabolismo ósseo de ratas intactas, OVX e OVX tratadas com 100, 200 e 300 μg de 17 β -estradiol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais:

Para realização deste estudo, foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (6 meses – Fig. 1), mantidas em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa) em ambiente com temperatura entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo de luz controlada (12/12 horas) e acesso livre à água e ração.

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da UNESP, *campus* de Araçatuba (protocolo nº 2008-005254).



Fig. 1 – *Rattus norvegicus albinus* (6 meses)

Ciclo estral:

O esfregaço vaginal (Fig. 2A) de todos os animais foi colhido para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã, segundo a técnica de Long & Evans (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico (Fig. 2B), durante 15 dias. Somente foram aceitos neste estudo animais que apresentaram ciclo estral regular.



Fig.2 A – Coleta de material para fazer esfregaço vaginal.

Fig 2B – Análise microscópica de esfregaço vaginal

Ovariectomia:

A ovariectomia (OVX - Fig. 3) foi realizada através de incisões laterais e exposição das porções distais do útero para a remoção dos ovários, sob anestesia com cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge/ 50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.). Após a cirurgia os animais receberam dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, 0,2 mL /animal, i.m.).

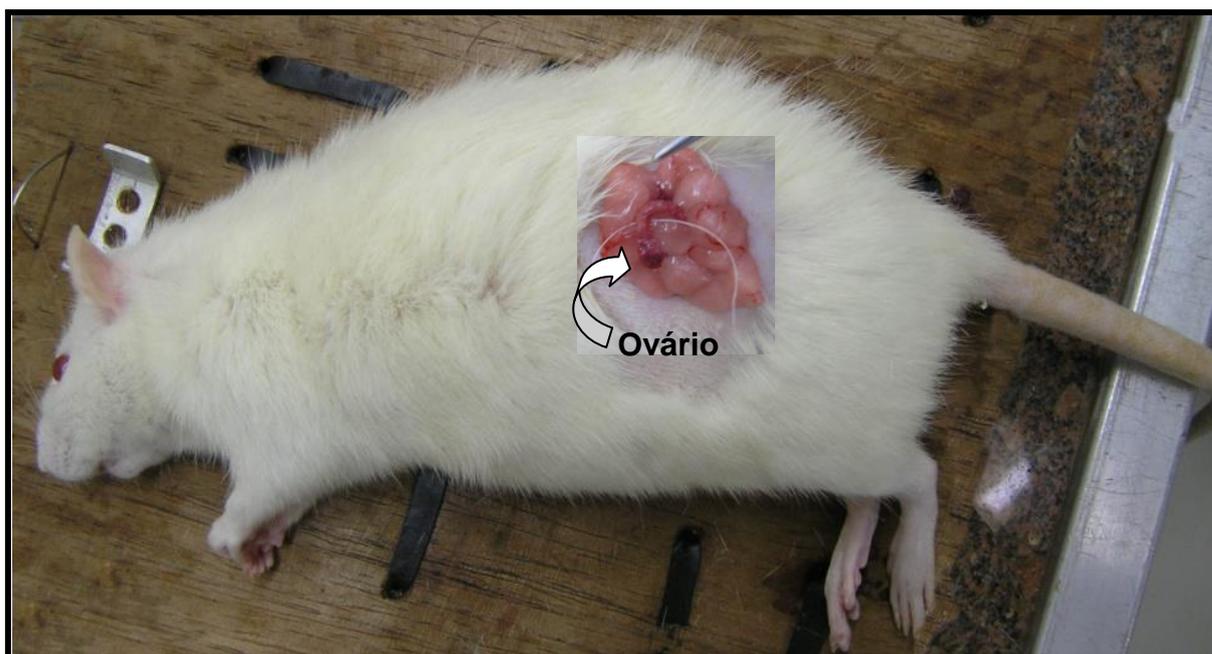


Fig. 3 – Ovariectomia em rata wistar

Terapia Substitutiva:

Após 15 dias da OVX os animais foram anestesiados com halotano e receberam implante subcutâneo de polietileno (Silastic, Dow Corning), contendo óleo de milho (grupo OVX/OM), 100, 200 ou 300 μ g de 17 β -estradiol (grupo OVX/E₂). Os implantes foram mantidos durante 60 dias, sendo realizada troca, aproximadamente, a cada 30 dias (Figs 4A e B).

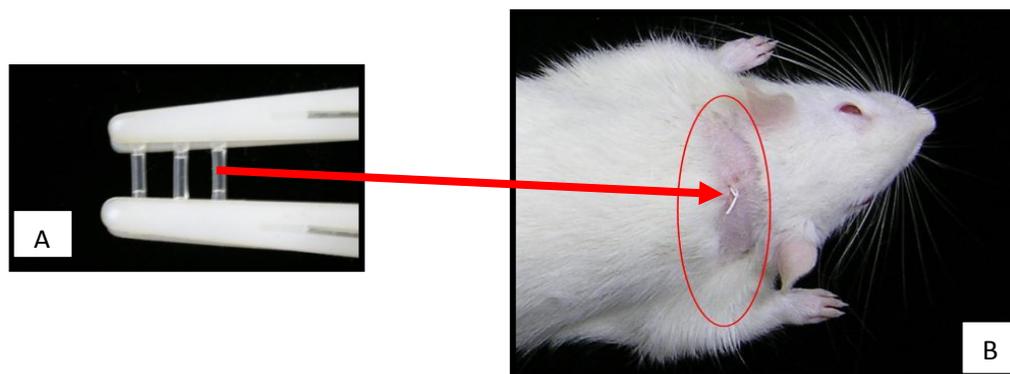


Fig. 4A – Pellets de polietileno contendo óleo de milho ou E_2 .

Fig. 4B – Imagem da região do implante subcutâneo do pellet.

Experimento:

Após 60 dias da reposição hormonal, os animais foram anestesiados para coleta sanguínea, de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda (1974), para dosagem de marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo. Em seguida, foram sacrificados por dose excessiva de anestésico e realizada a remoção dos fêmures para realizar o teste biomecânico.

Análises:

Foram realizadas análises bioquímicas para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo (cálcio, fósforo e fosfatase alcalina).

Cálcio: As determinações de cálcio foram realizadas através de método espectrofotométrico (Kit marca Labtest cat. 90; Figs 5A e B). O cálcio reagiu com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm.

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

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



Fig. 5A – Kits utilizados para as dosagens de Cálcio, fósforo ou fosfatase alcalina;
Fig. 5B – Espectofotômetro.

Estradiol: foi realizada dosagem da concentração plasmática de estradiol de todos os animais utilizados no projeto de pesquisa proposto, utilizando o kit para estradiol Maia (Adaltis Itália S.p. A), por radioimunoensaio.

Testes Biomecânicos:

Os testes biomecânicos de flexão em três pontos (Fig. 6A), com distância entre apoios de 20 mm em superfície e com velocidade de aplicação da carga (força) de 0,25mm/min, foram realizados na Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000. Os valores foram registrados em sistemas computacionais do próprio fabricante, que fornece diretamente os valores de força máxima admitidos pelo fêmur.

Na oportunidade dos ensaios, as peças ósseas foram retiradas do freezer para serem descongelados sob a ação da temperatura ambiente. Neste experimento foi aplicada força ântero-posterior, com velocidade de 0,25 mm/minuto e célula de carga de 2000 N. Devido à baixa velocidade com que a força foi aplicada, o ensaio foi do tipo Estático.

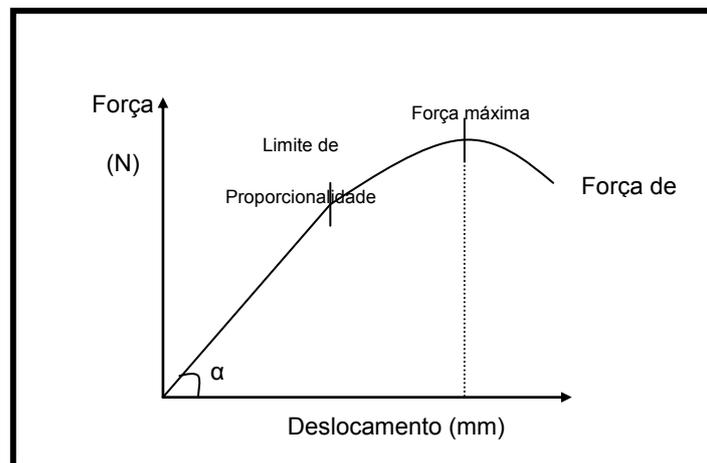
No ensaio de compressão na cabeça dos fêmures, os ossos foram fixados em aparato de aço para ficarem em posição vertical de maneira que a força aplicada na cabeça foi excêntrica com relação ao longo eixo do fêmur.

Os ossos foram ensaiados no Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Unesp/Araçatuba, em máquina de ensaio universal EMIC[®], com as deformações e cargas registradas e armazenadas automaticamente em computador acoplado ao sistema. Os dados foram, depois, transferidos para serem processados pelo programa EXCEL[®].

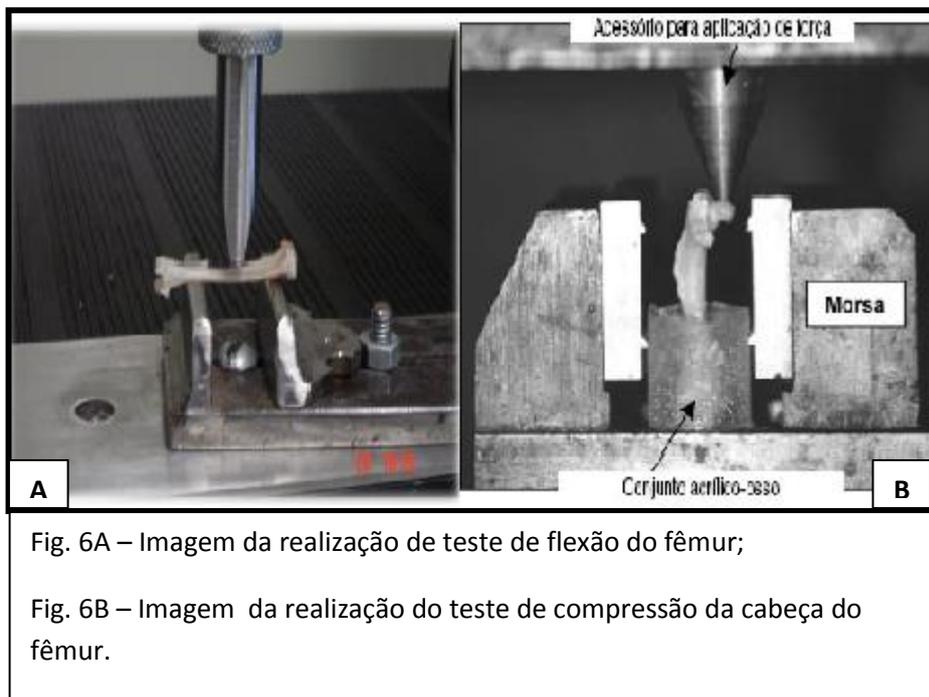
Com o programa EXCEL[®] foi traçada a curva carga (força) versus deslocamento (desenho abaixo). Esta curva forneceu os parâmetros força máxima e rigidez óssea. Esses parâmetros foram obtidos pela avaliação da curva de força X deslocamento na qual pode ser evidenciado: 1) a resistência óssea, analisando a força máxima admitida pelo tecido ósseo; 2) a força na ruptura; 3) a deflexão na força máxima.

A rigidez foi obtida através da tangente do ângulo α que indica a inclinação da curva carga x deslocamento na fase elástica (até o limite de proporcionalidade).

As forças máximas – Fmax foram utilizadas como critério de avaliação da resistência e é o maior valor de carga admitida em cada ensaio.



Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico



Análise Estatística:

Utilizamos as médias \pm EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas comparações.

RESULTADOS

A análise do esfregaço vaginal das ratas com 06 meses confirmou as 04 fases do ciclo estral (Fig. 7). A característica clínica dos cornos uterinos e a análise do ciclo estral confirmaram o sucesso da OVX e da reposição hormonal nos animais dos grupos OVX tratados ou não com E₂. O esfregaço vaginal das ratas dos grupos OVX/OM apresentou predominância de leucócitos, caracterizando o diestro, e seus úteros atróficos. Nos animais OVX pré-tratados com E₂, foi verificada a presença de células coniformes anucleadas e útero maior, quando comparado com os das ratas OVX/Óleo.

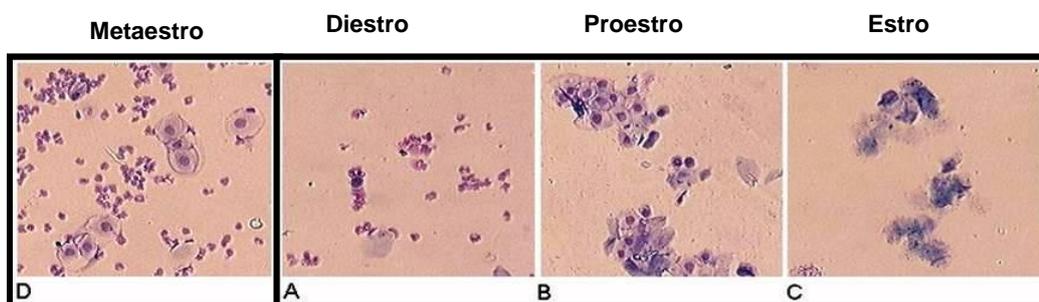


Fig. 7 – Fases do Ciclo Estral de ratas Wistar.

Fonte: <http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>

A concentração plasmática de estradiol foi significativamente maior no grupo de ratas intactas e menor no grupo de ratas OVXs. O tratamento de 8 semanas com pellets contendo 100, 200 ou 300 µg de estradiol, propiciou concentração plasmática elevada do esteróide de maneira dose-dependente (Fig. 8).

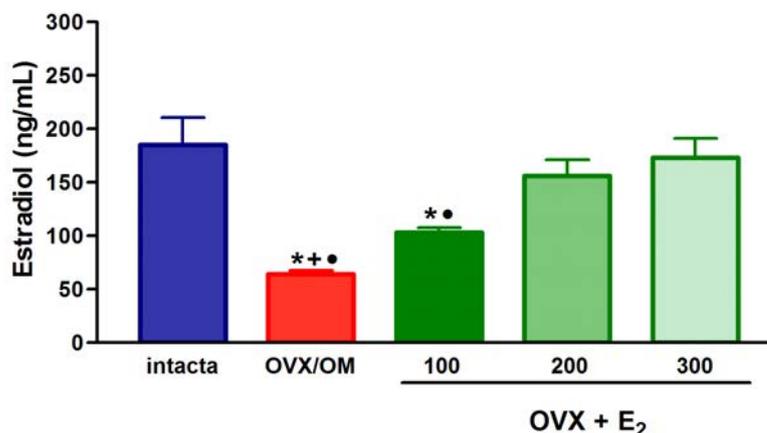


Fig. 8: Concentração plasmática de estradiol de ratas intactas, ratas OVX que receberam pellets com óleo de milho (OM), pré-tratadas com 100, 200 ou 300 µg de

estradiol. * $p < 0,05$ vs Intactas; ⁺ $p < 0,05$ vs 200 $\mu\text{g}/\text{E}_2$; [•] $p < 0,05$ vs 300 $\mu\text{g}/\text{E}_2$. N= 6-8 animais/grupos.

Analisando os gráficos de testes biomecânicos (Fig. 9) podemos notar que no teste biomecânico de compressão da cabeça do fêmur (a), que avaliou a força máxima (N) do osso trabecular, houve diferença significativa na força máxima entre o grupo tratado com 100 μg de E_2 comparado ao grupo tratado com 200 μg de E_2 . Foi necessário submeter o grupo de 100 μg a força máxima maior que os outros grupos para obter a compressão do fêmur. O teste biomecânico de flexão do terço médio (b), que avaliou a força máxima do osso cortical, não indicou diferença significativa entre os grupos estudados.

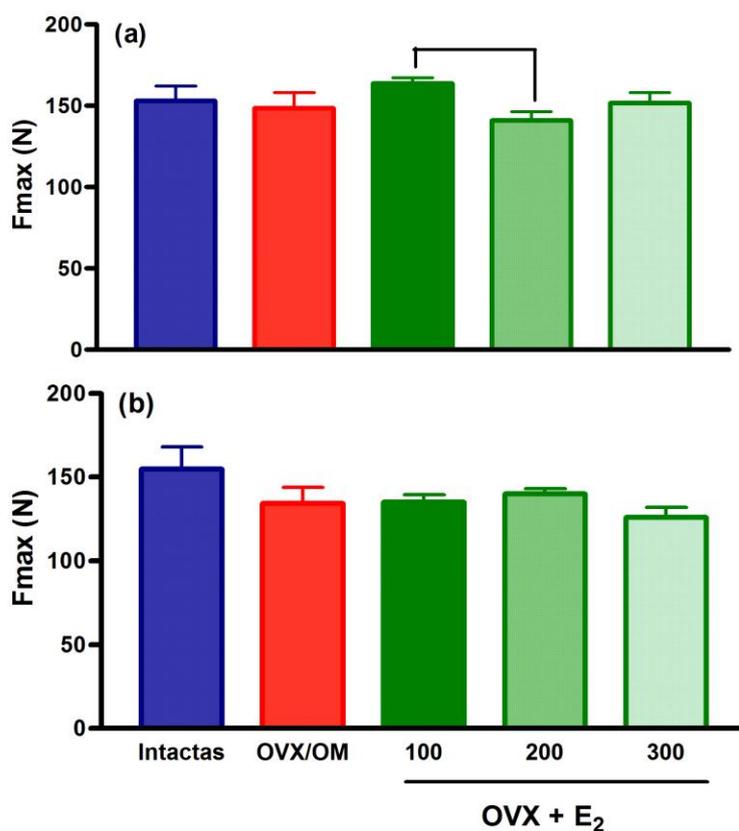


Fig. 9: Fmax (N) obtidas no ensaio de Compressão da cabeça do fêmur (a) e flexão do terço médio do fêmur (b) de ratas intactas, OVX que receberam pellets com óleo de milho (OVX/OM), OVX pré-tratadas com 100, 200 ou 300 μg de E_2 . N= 6-8 ratas/grupo.

A figura 10 apresenta os resultados médios e o EPM das concentrações plasmáticas de Cálcio (a), Fósforo (b) e Fosfatase Alcalina (c) de ratas intactas, OVX e OVX que receberam diferentes concentrações de estradiol.

As dosagens da concentração plasmática de cálcio (Fig. 10a) evidenciaram que não há diferença significativa entre os grupos estudados, ou seja, as diferentes concentrações de estradiol utilizadas neste estudo não alteraram a concentração plasmática de Ca.

O grupo de animais pré-tratados com 100 μg de estradiol apresentou a menor concentração plasmática de fósforo (Fig. 10b), principalmente quando comparado com o grupo de ratas intactas e OVX que receberam pellets contendo 300 μg de estradiol.

A análise de fosfatase alcalina (Fig. 10c), que é um indicador de formação óssea, constatou concentração plasmática significativamente menor no grupo de ratas OVX tratado com 200 μg de E_2 . Entre as ratas OVX e OVX tratadas com 100 e 300 μg não foi detectado diferença significativa na concentração plasmática de fosfatase alcalina.

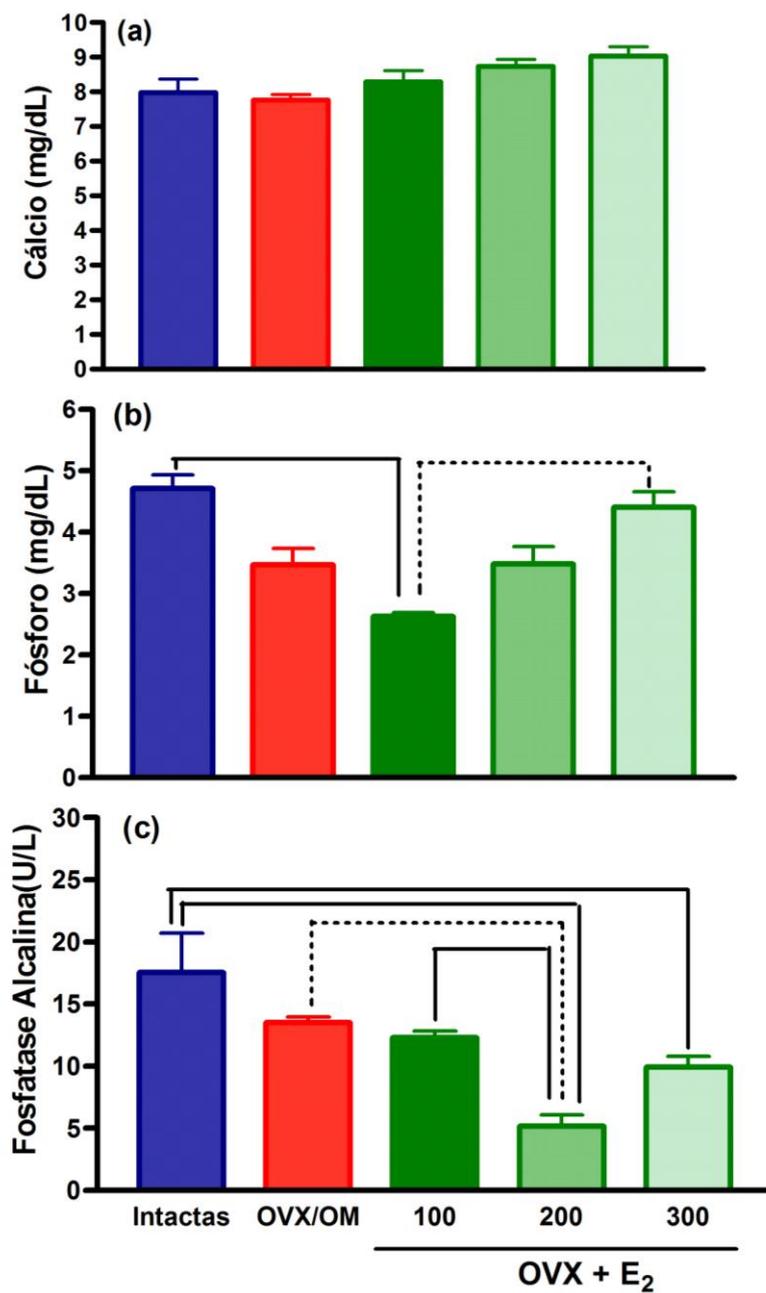


Fig. 10: Concentração plasmática de cálcio (a), fósforo (b) e fosfatase alcalina (c) de ratas intactas, OVX que receberam pellets com óleo de milho (OVX/OM), OVX pré-tratadas com 100, 200 ou 300 µg de E₂. N= 6-8 ratas/grupo.

DISCUSSÃO

O osso é um tecido extremamente ativo, sendo essa atividade voltada para a modelação e o crescimento nos esqueletos em desenvolvimento, e no adulto essa atividade metabólica envolve principalmente o processo de remodelação. Em mulheres menopausadas esse processo de remodelação óssea se encontra em desequilíbrio, causando um desarranjo no processo normal de regeneração óssea fisiológica. Todo esse processo também ocorre em ratas que foram privadas do suprimento endógeno de estrógeno, através da ovariectomia, por exemplo.

O tratamento de reposição hormonal em ratas ovariectomizadas é amplamente utilizado como modelo de estudo para a osteoporose, primeiramente porque o osso da rata apresenta hierarquia organizacional bem definida, e foi observado que depois da ovariectomia a superfície do fêmur das ratas apresenta fossas de reabsorção visivelmente profundas, confirmando ratas ovariectomizadas como bom modelo de estudo de osteoporose para mulheres na pós menopausa (Netto *et al.*, 2006; Vashishth, 2008). Em estudos realizados por Modder (2004), foi demonstrado que a reposição hormonal, em ratas, através de implante subcutâneo de pellets, com a liberação lenta de concentrações específica de estrógeno para esses animais, é a maneira mais eficaz de tratamento, evitando manipulação e trauma associados a injeções subcutâneas diárias, bem como as variações de picos e declínios com relação à concentração de estrógeno injetada.

Foi observado na literatura (Modder *et al.* 2004), que a reposição hormonal em ratas com 6 meses de idade apresentou efeitos no osso cortical e trabecular, enquanto que em ratas mais jovens o osso foi menos sensível à exposição de estrógeno e uma quantidade baixa desse hormônio desencadeou respostas uterinas dramáticas, justificando portanto a utilização de ratas com 6 meses de idade nesse trabalho.

Concentrações baixas de estrógeno utilizadas em modelos de reposição hormonal com ratas ovariectomizadas (Modder *et al.*, 2004) foram suficientes para impedir a perda de osso cortical e esponjoso somadas à vantagem de não desenvolver efeitos estimulantes em outros tecidos, como por exemplo, a hipertrofia do útero. Assim como na literatura, os resultados encontrados no presente estudo demonstraram resposta melhor à reposição hormonal, no grupo tratado com a menor concentração de estrógeno (100 µg de E₂), indicando também provável diminuição de danos a outros tecidos, quando comparados aos grupos tratados com 200 e 300 µg de E₂.

Testes biomecânicos realizados em ratas intactas e ratas ovariectomizadas (Netto *et al.*, 2006) demonstraram que a supressão de estrógeno pela ovariectomia em ratas causou redução na qualidade do osso, o qual apresentou várias fossas de reabsorção quando foi analisado por microscopia óptica de varredura. Num estudo que visou avaliar as associações quantitativas e qualitativas entre a densidade de osteócitos e a microestrutura biomecânica das trabéculas ósseas vertebrais em ratas, demonstrou que a densidade de osteócitos diminui no osso trabecular de ratas ovariectomizadas e aumenta proporcionalmente as lacunas vazias de osteócito, com características de osteócito apoptótico, e quando as ratas foram submetidas à reposição hormonal de estrógeno, houve aumento na qualidade biomecânica do osso e também na viabilidade do osteócito, indicando que a densidade de osteócitos está positivamente correlacionada à qualidade biomecânica do osso (Ma *et al.*, 2008). Os testes biomecânicos de flexão dos três pontos, realizado no presente estudo para análise do osso cortical, não evidenciou diferenças significativas entre os grupos, no entanto o teste de compressão apresentou valores significativos, podendo concluir que o processo de reposição hormonal afeta mais a microestrutura do osso trabecular do que o osso cortical.

Resultados interessantes são apresentados pelo grupo de Wehrli (2010) ao verificarem a viabilidade da utilização da análise pelo método dos elementos finitos baseado em análise de ressonância magnética de ossos (rádio e tíbia) de mulheres após a menopausa. Estes autores constataram diferenças significativas entre os grupos de referência em relação à rigidez axial dos sítios anatômicos analisados, enfatizando que a depleção e suplementação de estrogênio afetam também o córtex. Os resultados são contrários à noção de que, em curto prazo, as alterações de remodelação após a menopausa (tanto a diminuição da massa óssea, devido a uma redução nos níveis de estrógeno, quanto o acréscimo de massa óssea causado pela suplementação hormonal) afetam principalmente osso trabecular, que remodela mais rápido do que o osso cortical. Os resultados obtidos em relação ao osso trabecular, com aumento de módulos elástico e de cisalhamento, bem como da rigidez axial no grupo estradiol sugerem que a suplementação de estrogênio não apenas preserva, mas na verdade aumenta a resposta mecânica do osso, em contraste com estudos estruturais anteriores indicando mera preservação. Estes resultados corroboram com os obtidos neste estudo em que detectamos resistência maior à compressão da cabeça do fêmur dos animais que receberam 100 µg de E₂.

Nas análises bioquímicas foi possível constatar níveis séricos normais de cálcio, sem mudanças significativas entre os grupos, confirmando os dados encontrados na literatura de que somente em circunstâncias extremas como hiperparatireoidismo, ou desnutrição, a concentração sérica desse mineral sofre alterações.

Com relação às concentrações plasmáticas de fósforo foi verificada uma menor concentração plasmática no grupo tratado com 100 μg de E_2 , podendo levantar duas hipóteses para tal resultado. A primeira hipótese, e mais provável visto que esse grupo apresentou melhor densidade óssea, é que o fósforo foi depositado no osso e se ligou ao cálcio dando origem a nova microarquitetura óssea. A segunda hipótese é que o fósforo foi excretado na urina.

A fosfatase alcalina, que é uma enzima envolvida na mineralização da matriz óssea, e funciona como marcador da formação óssea, pois indica a atividade osteoblástica, foi encontrada em níveis séricos em maior concentração nas ratas tratadas com 100 μg de E_2 quando comparadas com os grupos de 200 e 300 μg de E_2 concluindo que realmente no primeiro grupo houve melhor resposta óssea à concentração de 100 μg de E_2 .

CONCLUSÃO

Podemos concluir a partir dos estudos realizados nesse trabalho que a suplementação de 100 μg de E_2 preserva e melhora a resposta mecânica da região epifisária proximal dos fêmures de ratas OVX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS J.C; BRINCAT M.P. Effects of hormone replacement therapy on connective tissue: why is this important? **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.**, v. 23, n.1, p. 121-127, 2009.

AMADEI S.U. et al. Influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

BOYDE A.; ALI N.N.; JONES S.J.R. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. **Br Dent J.**, v. 156, n. 6, p. 216-20, 1984.

FRICK K.M. Estrogens and age-related memory decline in rodents: What have we learned and where do we go from here? **Hormones and Behavior.**, v. 55, n.1, p. 2-23, 2008.

HARMS P.G.; OJEDA S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J appl physiol.**, v.36, p. 391-92, 1974.

HEANEY R.P. Remodeling and skeletal fragility. **Osteoporosis International.**, v. 14, n.5, p. 12-15, 2003.

HILL P.A.; ORTH M. Bone remodeling. **Br J Orthod.**, v. 25, n. 2, p. 101-107, 1998.

JILKA R.L. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. **Bone.**, v. 23, p. 75-81, 1998.

VASHISHTH D. Small animal bone biomechanics. **Bone.**, v. 43, p 794-797, 2008.

KANIS J.A. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. **Bone.**, v. 19, n.15, p. 185-190, 1996.

LINDSAY R. Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis. **In:Riggs BL (ed) Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management.**, Raven Press, New York, p. 333-358, 1988.

LONG J.A.; EVANS H.M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. **Mem. Univer.Calif.**, v. 6, p. 1-148, 1922.

MA Y.L. et al. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. **Journal of biomechanics.**, v. 41, p 1324-1332, 2008.

MANOLAGAS S.C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 115-137, 2000.

MANOLAGAS S.C.; JILKA R.L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling - emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **N Engl J Med.**, v. 332, p. 305-311, 1995.

MANOLAGAS S.C.; KOUSTENI S.; JILKA R.L. Sex steroids and bone. **Journal Recent Progress in Hormone Research.**, v. 57, p. 385-409, 2002.

MEGHJI S. Bone remodeling. **Br Dent J.**, v. 172, n. 6, p. 235-42, 1992.

MODDER U.I.L. et al. Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. **European Journal of Endocrinology.**, v. 151, p. 503-510, 2004.

NETTO C.C. et al. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. **R. Ci. méd. biol., Salvador.**, v. 5, n. 3, p. 231-238, 2006.

OKAMOTO T.; RUSSO M.C. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. **Rev Fac Odontol Araçatuba.**, v. 2, p. 153-69, 1973.

PACIFICI R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis - the second decade. **Endocrinology.**, v. 139, p. 2659-2661, 1998.

RIBEIRO A.F. de C. Eficiência dos Hormônios Sexuais na Gênese da Osteoporose. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 47, n. 3, São Paulo , 2003.

SHIMIZU M. et. Al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. **Journal of Electron Microscopy.**, v. 47, n. 5, p. 517-26, 1998.

WEHRLI F.W. et. al. Mechanical implications of estrogen supplementation in early postmenopausal women. **J Bone Miner.**, v. 25, n. 6, p. 1406-1414, 2010.