



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

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

WAGNER GARCEZ DE MELLO

**Efeitos da castração e androgenização
neonatal sobre o dimorfismo sexual
esquelético e secreção de leptina e
corticosterona em ratos**

ARAÇATUBA-SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

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

WAGNER GARCEZ DE MELLO

Efeitos da castração e androgenização
neonatal sobre o dimorfismo sexual
esquelético e secreção de leptina e
corticosterona em ratos

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

2011

DEDICATÓRIA

A minha família por partilharem dos meus sonhos, das minhas lutas, e por renovarem, a cada dia, minhas forças. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, não por formalidade, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. João Cesar Bedran de Casto, cujos conhecimento iluminador e entusiasmo contagiante foram fundamentais para que este trabalho fosse efetuado com sucesso. Agradeço pela oportunidade oferecida, pela orientação, além da amizade formada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues, grande referência intelectual, um exemplo a ser seguido. Agradeço por sua orientação científica criteriosa, por contribuir para o meu crescimento profissional e nos apoiar em todos os momentos necessários

Concentro neles minhas ambições como educador e pesquisador.

Aos meus pais, avós e familiares por me proporcionarem uma formação sólida e por sempre me incentivarem nos estudos, dando o suporte necessário para chegar até aqui, meu eterno agradecimento.

A minha mulher, Ana Lúcia, fonte de amor e inspiração. Por toda sua dedicação a nossa família e por me apoiar incondicionalmente na realização de meus sonhos.

Ao meu filho Vinícius, razão da minha vida, que, a despeito da pouca idade, soube compreender os momentos que não pude estar presente. É por ele que batalho dia a dia por um futuro digno.

AGRADECIMENTOS

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

A coordenadora local do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Professora Dr. Rita Cássia Menegati Dorneles pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal.

Aos professores, Dr^a. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada e Dr. Cláudio Aparecido Casatti pela ajuda com a parte experimental e por terem nos dado livre acesso aos seus respectivos laboratórios.

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

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

A todos aqueles que, de diferentes formas me ajudaram neste percurso e que por limitações da memória, não tenham sido aqui referenciados...

SINCERAMENTE, MUITO OBRIGADO!

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da CAPES
através da concessão de bolsa de estudos

EPÍGRAFE

“Moços, nesta escola o Governo do Estado vos proporciona os meios de vencer na vida. O vosso sucesso depende, porém, de esforço e persistência no estudo e no trabalho. Lembrai-vos, pois, que na vida só o indivíduo pode lançar os alicerces da própria felicidade”.

(FERNANDO COSTA)

MELLO, W. G. **EFEITOS DA CASTRAÇÃO E ANDROGENIZAÇÃO NEONATAL SOBRE O DIMORFISMO SEXUAL ESQUELÉTICO E SECREÇÃO DE LEPTINA E CORTICOSTERONA EM RATOS.** 2011. 54 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 – 2011.

RESUMO

Para estudar os efeitos da castração e androgenização neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético, bem como, secreções de leptina e corticosterona. Ratos Wistar, neonatos foram divididos em quatro grupos do mesmo sexo (n = 06-08 por grupo). Os machos foram castrados ou sham-operados nas primeiras 24h de nascimento. As fêmeas receberam injeções subcutâneas diárias de 100mg de propionato de testosterona em 50µl de óleo de milho, ou somente o veículo durante 05 dias. Os animais foram pesados semanalmente para acompanhar a evolução da massa corporal e eutanasiados aos 20, 40 e 120 dias, onde foram coletados sangue e os fêmures para determinação do comprimento e espessura, realizadas com auxílio de um paquímetro. A densidade mineral óssea areal (DMO areal) foi determinada por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios-X e, o ensaio mecânico de flexão foi realizado para a aquisição e cálculo das propriedades estruturais: força máxima, rigidez e tenacidade. As amostras sanguíneas foram utilizadas para determinar as concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, bem como as concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona. Os resultados evidenciam que o ganho de massa corpórea, DMO areal e propriedades biofísicas aumentaram rapidamente com o envelhecimento em todos os grupos, confirmando que em animais controle, o dimorfismo sexual esquelético e o padrão dimórfico de secreção da leptina e corticosterona são evidenciados após a puberdade. No entanto, a exposição neonatal a andrógenos induz alterações no crescimento, com DMO areal e qualidade óssea aumentadas em fêmeas androgenizadas, levando a um padrão masculinizado no desenvolvimento. Por outro lado, machos castrados no período neonatal apresentaram fragilidade óssea, com tenacidade e força máxima reduzidas em todas as fases comparados com machos sham-castrados. Estes resultados sugerem ainda, que a exposição ou ausência de andrógenos no período neonatal pode ser uma das covariáveis que medeiam o padrão secretório dimórfico dos hormônios leptina e corticosterona. Portanto, os dados do presente trabalho demonstram que a manipulação do ambiente androgênico durante o período crítico de diferenciação do cérebro causa alterações em longo prazo no desenvolvimento esquelético e concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona, sendo ainda, um modelo útil para a investigação dos distúrbios ósseos relacionados ao hipogonadismo hipotalâmico. Estes resultados fornecem uma nova visão sobre a complexidade dinâmica da homeostase da massa óssea.

PALAVRAS CHAVE: Dimorfismo Sexual, Esteróides Sexuais, Osso, Leptina, Corticosterona

MELLO, W. G. **EFFECTS OF NEONATAL CASTRATION AND ANDROGENIZATION ON SEXUAL DIMORPHISM IN BONE, AND LEPTIN AND CORTICOSTERONE SECRETION.** 2011. 54 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 – 2011.

ABSTRACT

To study the effects of neonatal castration and androgenization on sexual dimorphism in bone, and leptin and corticosterone secretion, Wistar rats, newborns, were divided into four groups (n = 06-08 per group) of the same sex. Male pups were cryoanesthetized and castrated or sham/castrated by 24 hours after birth; female pups from separate litters were injected SC with testosterone propionate 100 µg in 50µL corn oil or oil vehicle 50µL during 05 days and were euthanized by 20, 40, and 120 postnatal day. Were collected blood samples, and femurs. The animals were weighed weekly to monitor the evolution of body mass, and the length and thickness of the femurs were performed with aid of a caliper. The Areal Bone Mineral Density (areal BMD) was determinate by Dual-energy X-ray Absorptiometry and, Biomechanical Three-Point Bending Testing; these data were used for the acquisition and calculation of the structural properties: Ultimate Strength, Toughness, and Stiffness. The blood samples were subjected to a biochemical assay to estimate the serum levels of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase; and serum leptin and corticosterone concentration. The results showed that weight gain, areal BMD and biomechanical properties increased rapidly with aging in all groups, and confirm that in control animals, skeletal sexual dimorphism, and serum leptin concentration, and a dimorphic pattern in serum corticosterone concentration evidenced after puberty. However, the neonatal exposed to androgen induced changes in growth, areal BMD and bone mass quality in androgenized females, leading to a masculinization pattern in development. On the other hand, neonatally castrated males had the bone development and quality of the mechanical properties similar to those control females. These results suggest that the presence or absence of exposure to neonatal androgen may represent at least one covariate that mediates the dimorphic variation in leptin and corticosterone secretion. Thus, the data of the present study demonstrate that manipulation of the androgen environment during the critical period of sexual differentiation of the brain causes a long-lasting modification in bone development, and serum leptin and corticosterone concentration, and also provide a useful model for investigation of changes induced by hypogonadism hypothalamic bone disorders.

KEYWORDS: Sexual Dimorphism, Sex Steroids, Bone, Leptin, Corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Orquidectomia neonatal: Cirurgia realizada até 24 horas após o nascimento.	21
Figura 2 -	Androgenização neonatal: Administração de PT durante os cinco primeiro dias de vida.	22
Figura 3 -	Modelo de Curva Força-Deslocamento (modificado de Turner e Burr, 1993)	24
Figura 4 -	Parâmetros Biométricos	29
Figura 5 -	Densitometria Óssea	32
Figura 6 -	Ensaio Mecânico	33
Figura 7 -	Radioimunoensaios para determinação das concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona	36
Figura 8 -	Ensaio bioquímicos para determinação das concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros Biométricos.	27
Tabela 2 -	Parâmetros Biométricos.	30
Tabela 3 -	Radioimunoensaios e Análises Bioquímicas.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP = α -fetoproteína

AR = *androgen receptor* (receptor de andrógenos)

AR-ER α KO = androgen-estrogen alpha-knockout

ARKO = androgen receptor alpha-knockout

BAX= *bcl-2-associated X protein*

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

DS = dimorfismo sexual

EPM = erro padrão da média

ER = *estrogen receptor* (receptor de estrógenos)

ER α KO = estrogen receptor alpha-knockout

ER β KO = estrogen receptor beta-knockout

FAK = *focal adhesion kinase* (quinases de adesão focal)

GABA = *gamma-aminobutyric acid* (ácido gama- aminobutírico)

GH = *growth hormone* (Hormônio do crescimento)

GnRH = *gonadotropin-releasing hormone* (Hormônio liberador de gonadotrofinas)

HPA = *hypothalamus-pituitary-adrenal* (Hipotálamo-Hipófise-Adrenais)

HPG = *hypothalamus-pituitary-gonadal* (Hipotálamo-Hipófise-Gônadas)

IGF-1 = *insulin-like growth factor – 1* (fator de crescimento semelhante a insulina)

PT = propionato de testosterona

SDN-POA = *sexually dimorphic nucleus of the preoptic area* (núcleo sexualmente dimórfico da área preóptica medial)

SNC = sistema nervoso central

SUMÁRIO

1.0	Introdução	15
1.1	Diferenciação sexual no cérebro	15
1.2	Esteróides Sexuais e Dimorfismo Sexual Esquelético	16
1.3	Puberdade e desenvolvimento esquelético	17
1.4	Interrelação entre Esteróides Sexuais, Corticosterona e Leptina.	19
2.0	Objetivos	20
3.0	Materiais e Métodos	21
3.1	Animais	21
3.2	Orquidectomia neonatal	21
3.3	Androgenização neonatal	22
3.4	Protocolo Experimental	22
3.5	Parâmetros Avaliados	23
3.5.1	Biometria	23
3.5.2	Parâmetros Biofísicos	23
3.5.3	Parâmetros Bioquímicos	25
3.5.4	Dosagem Hormonal	26
4.0	Análises Estatísticas	26
5.0	Resultados	27
5.1	Parâmetros Biométricos	27
5.1.1	Desenvolvimento Ponderal	28

5.1.2	Comprimento e Espessura dos Fêmures	28
5.2	Parâmetros Biofísicos	30
5.2.1	Densitometria Óssea	30
5.2.2	Ensaio Mecânico	31
5.3	Análises Sanguíneas	34
5.3.1	Radioimunoensaios	35
5.3.2	Ensaio Bioquímicos	35
6.0	Discussão	38
7.0	Conclusões	43
	Referências	44
	Anexos	52

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Diferenciação sexual no cérebro

A importância dos androgênios na diferenciação sexual do cérebro foi proposta pela primeira vez na obra publicada por Phoenix e Young (1959), demonstrando efeitos organizacionais/ativacionais promovidos por esteróides sexuais no desenvolvimento e diferenciação do cérebro de mamíferos durante a fase perinatal. A hipótese organizacional/ativacional é em essência um suporte estrutural para o conceito de que a ação hormonal no início da vida exerce efeitos permanentes (organizacionais) sobre a arquitetura neural que é então posta em prática (efeitos ativacionais) na fase adulta (MCCARTY, 2004).

Estudos similares em ratos, conduzidos por Barraclough e Gorski (1961), avaliaram o impacto desse dimorfismo sexual (DS) na fisiologia reprodutiva e comportamental. Segundo esta hipótese, o cérebro de mamíferos se diferencia de acordo com o ambiente hormonal ao qual ele é exposto, e essa diferenciação ocorre em períodos críticos do desenvolvimento. Em ratos esse período vai do 19º dia de gestação até o sétimo dia após o nascimento, onde desenvolvimento feminino ocorre sem a necessidade de exposição a nenhum hormônio, já que, ratas neonatas não secretam quantidades suficientes de estrógenos antes do sétimo dia após o nascimento e os estrógenos produzidos pelas gônadas e placenta da mãe ligam-se com alta afinidade a α -fetoproteína (AFP), uma glicoproteína produzida em grande quantidade pelo fígado dos fetos que neutraliza sua ação junto ao cérebro. Já a testosterona secretada pelas células de Leydig nos testículos não tem afinidade a essa proteína, atravessando assim a membrana plasmática dos neurônios onde é aromatizada em estradiol, podendo então atuar masculinizando e defeminizando os substratos e estruturas neurais, caracterizando assim, o comportamento masculino (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961). Estudos em relação a atuação da AFP realizados por McEwen et al. (1975), confirmam a importância desta proteína na diferenciação cerebral.

Outros estudos realizados por Gorski et. al. (1978, 1980), demonstraram, a existência de diferenças morfológicas na área préóptica medial, descrevendo um intenso agrupamento neuronal 3 a 7 vezes maior em machos do que em fêmeas,

mostrando ainda que o tratamento hormonal poderia reverter estas diferenças; ele denominou essa região como núcleo sexualmente dimórfico da área preóptica medial (SDN-POA). Gorski et al., (1991) demonstraram ainda, que o processo de diferenciação afeta, além do hipotálamo, outras regiões do sistema nervoso central (SNC) modulando e mantendo os mecanismos homeostáticos. Em diversos outros estudos, diferenças foram encontradas nas concentrações noradrenérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas e na expressão de receptores monoaminérgicos no hipotálamo e na Amígdala, demonstrando o efeito direto dos andrógenos no desenvolvimento organizacional dos neurotransmissores (GORDON et. al., 1974, ORENSANZ et. al., 1982, SIDDIQUI; GILMORE, 1988, VACCARI, 1980). Estes trabalhos clássicos levaram a diversos outros estudos em relação ao DS em mamíferos tentando desvendar em que medida os esteróides sexuais que atuam sobre o cérebro durante a infância, moldam o desenvolvimento do indivíduo até a vida adulta em todos os seus aspectos. McMacarthy (2010) demonstrou os mecanismos moleculares pelos quais os andrógenos exercem seus efeitos organizacionais durante o período de diferenciação, apontando modificações na sinaptogênese e apoptose neuronal, destacando a ação de moléculas sinalizadoras como o TNF- α , BAX, GABA, glutamato, prostaglandinas E₂, FAK e paxilinas.

1.2 Esteróides Sexuais e Dimorfismo Sexual Esquelético

Os hormônios sexuais também são considerados como os principais mediadores do dimorfismo sexual esquelético. Esse dimorfismo foi tradicionalmente atribuído a uma ação estimulatória dos androgênios e inibitória dos estrogênios no crescimento radial e formação periosteal dos ossos em machos e fêmeas respectivamente. Porém, segundo Callewaert et. al. (2010a) e Vanderschueren et. al. (2004) a ação dos esteróides sexuais no tecido ósseo, principalmente em machos, seria mais complexa, já que a testosterona ativaria não somente receptores de andrógenos (AR), mas após serem aromatizados em 17 β -estradiol, ativariam receptores de estrógenos (ER α e/ou ER β). A presença de AR e ER α são fundamentais para o desenvolvimento cortical. Callewaert et. al. (2009) demonstraram uma redução da massa óssea cortical em camundongos AR-ER α KO quando comparados a camundongos ARKO e/ou ER α KO somente. A importância da

aromatização dos andrógenos para a formação cortical também é observada em humanos, onde adolescentes com deficiência na expressão da enzima aromatase apresentam redução da espessura cortical (BOUILLON et. al 2004).

Durante a vida, o esqueleto está em contínuo processo de formação e reabsorção, em que, o aumento ou a diminuição da massa óssea é dependente do equilíbrio entre esses processos que são regulados principalmente por ações hormonais (MOSLEY, 2000). O tecido ósseo tem a capacidade de adaptar a sua composição material e estrutural conforme os estímulos aos quais é submetido (SEEMAN, 1997). Os hormônios sexuais, entre outros fatores, são responsáveis por estimularem a maquinaria celular que regula a remodelação e, um desequilíbrio neste processo pode comprometer as propriedades mecânicas do tecido, ocasionando falhas estruturais e consequentemente fraturas ósseas (DUAN Y, 2003). Em seu trabalho, Turner et al. (1990), observaram uma redução do perímetro periosteal em ratos orquidectomizados durante a fase de crescimento e um aumento da circunferência periosteal em fêmeas ovariectomizadas no mesmo período. Estas diferenças tornam-se mais evidentes após a puberdade, o resultado é um DS caracterizado por ossos de maior comprimento, maiores perímetros interiores e exteriores e maior volume cortical em machos quando comparados as fêmeas (GARN, 1970, RIGGS et al., 2002).

1.3 Puberdade e desenvolvimento esquelético

A puberdade compreende o período de transição entre a infância e a vida adulta, e é marcada por alterações das concentrações circulantes de gonadotrofinas e aumento dos esteróides sexuais, caracterizando o estágio final da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) (LEE, 1995, WU et. al., 1996).

A altura pré-puberal e a velocidade de crescimento são similares em garotos e garotas. Durante a puberdade, ambos os sexos experimentam uma velocidade de crescimento maior que qualquer idade pós-natal desde a infância (GRABER J. A. et al. 1995). No esqueleto em desenvolvimento, os hormônios sexuais têm ações de promoção do crescimento e amadurecimento dos condrócitos e osteoblastos, entre outros constituintes ósseos (GRUMBACH M. M.; AUCHUS R. J., 1999, GRUMBACH M. M, 2000, RIGGS et al., 2002). A fusão epifisária e a interrupção do crescimento

em ambos os sexos, é mediada por estrogênio, seja ele secretado de forma direta (em garotas) ou através da aromatização de androgênios (em garotos) (GRUMBACH M. M.; AUCHUS R. J., 1999, GRUMBACH M. M, 2000). Em geral, pacientes hipogonádicos apresentam fusão epifisária atrasada e ausência do estirão puberal do crescimento (GRUMBACH M. M.; AUCHUS R. J. 1999).

Doenças estruturais do SNC podem causar deficiência na síntese de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou das gonadotrofinas levando ao quadro clínico conhecido por hipogonadismo hipogonadotrófico. (BRITO et al., 2005). Embora várias publicações descrevam alterações do desenvolvimento esquelético relacionadas a este distúrbio em humanos (CHEVALLEY et al., 2009, PARK et al., 1999,), existem ainda, poucos estudos sobre esta fisiopatologia em modelos animais, e, a maioria utilizando a administração de antagonistas do GnRH no período próximo à puberdade (YINGLING; KHANEJA, 2006, YINGLING et al., 2007, YINGLING ; TAYLOR, 2008).

Ainda que estes estudos tenham obtido importantes contribuições, os modelos utilizados mostram alterações em curto prazo com déficit transitório da massa óssea e estrutura, não apresentando diferenças significativas quando os animais atingem a maturidade. Esses resultados, segundo os próprios autores, demonstram limitações do modelo utilizado, já que não mimetizam as manifestações clínicas encontradas na puberdade tardia e/ou hipogonadismo hipogonadotrófico (YINGLING; KHANEJA, 2006). Sendo assim, modelos animais mais adequados e estudos longitudinais melhor delineados tornam-se necessários para a investigação das alterações causadas por distúrbios neuroendócrinos relacionados ao desenvolvimento esquelético.

1.4 Interrelação entre Esteróides Sexuais, Corticosterona e Leptina.

Evidências demonstraram a interrelação entre os eixos HPG, hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e leptina. Está bem estabelecido na literatura, que os hormônios do eixo HPA podem inibir a atividade do eixo HPG. Os mecanismos pelos quais isso ocorre são numerosos, sendo demonstrado que os glicocorticóides podem inibir a secreção de gonadotrofinas (RINGSTROM; SHWARTS, 1985), assim como, inibir a liberação de GnRH (DUBEY; PLANT., 1985). Outros estudos demonstram efeitos diretos do CRH (por meio de conexões sinápticas), ou indiretos (por meio da circulação sanguínea), alterando a liberação de GnRH (RIVIER; VALE, 1984, MACLUSKY et al., 1988), podendo ser completado por efeitos parácrinos ao nível da eminência mediana, uma vez que evidências sugerem que o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) atua neste locus inibindo a liberação de GnRH (JINGAMI, 1985). Em qualquer uma das situações supracitadas, os estímulos do eixo HPA sobre o eixo HPG são inibitórios.

Os hormônios sexuais possuem efeitos ativacionais sobre o eixo HPA durante a idade adulta, com influências excitatórias ou inibitórias diretamente nas adrenais, e também em nível hipotalâmico, alterando o número de neurônios secretores de CRH no núcleo paraventricular, na tentativa de prevenir os efeitos deletérios da ativação do HPA na função reprodutiva (PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004, , VIAU, 2002).

Por outro lado, na fase adulta, a leptina também participaria do controle do eixo HPA modulando a secreção de CRH (HEIMAN et al., 1997), e ainda, influenciaria fortemente a função reprodutiva durante toda a vida adulta do indivíduo por ações no hipotálamo e hipófise (PINILLA et al., 1999, SPIEGELMAN; FLIER, 1996, YU et al. 1997). Consequentemente, nós observamos a possível interação das influências organizacionais dos esteróides sexuais sobre o eixo HPA e secreção de leptina.

2.0 OBJETIVOS

Portanto, este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da castração e androgenização neonatal, que sabidamente determinam alterações regionais hipotalâmicas sobre o conteúdo de catecolaminas, alterando a liberação dos hormônios gonadotróficos e induzindo efeitos irreversíveis no SNC e endócrino, sobre o desenvolvimento corporal e propriedades biofísicas ósseas, bem como, determinar se as alterações hipotalâmicas causadas por este modelo podem influenciar as secreções de leptina e corticosterona em animais pré-púberes, púberes e adulto-jovens.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) recém-nascidos, cedidos pelo Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA-UNESP. Os mesmos foram mantidos em temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz 12h/12h com início às 07:00h, e, após o desmame realizado aos trinta (30) dias, foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP-Araçatuba (CEEA - protocolo 2008-002331 – ANEXO 1).

3.2 Orquidectomia neonatal

Os machos neonatos com no máximo 24h de vida, foram submetidos à crioanestesia (20 min a -20°C), a seguir, a orquidectomia foi realizada através de incisão transversal entre o umbigo e o pênis. O peritônio foi perfurado com uma tesoura westcott reta e os testículos foram localizados próximos da linha mediano-lateral, mais próximo do pênis do que do umbigo. Os testículos foram separados por corte longo abaixo do feixe vâsculo-nervoso, e, a seguir, feita sua retirada. A sutura peritoneal não foi realizada e a incisão da pele foi unida através de adesivo cirúrgico. Na cirurgia de orquidectomia fictícia, foi feita a mesma incisão entre umbigo e o pênis, até a perfuração do peritônio, porém sem a retirada dos testículos (Figura 1).



Figura 1 - Orquidectomia neonatal: Cirurgia realizada até 24 horas após o nascimento.

3.3 Androgenização neonatal

As fêmeas neonatas receberam injeções subcutâneas diárias com 100 µg de Propionato de Testosterona (PT) diluídos em 50 µl óleo de milho durante os primeiros cinco dias de vida. As fêmeas que formaram os grupos sham receberam apenas o veículo durante o mesmo período. (Figura 2)



Figura 2 - Androgenização neonatal: Administração de PT durante os cinco primeiros dias de vida.

3.4 Protocolo Experimental

As ninhadas foram separadas logo ao nascimento em quatro grupos experimentais (n = 6-8 por grupo): a) Machos sham-castrados; b) Machos castrados; c) Fêmeas controle e d) Fêmeas androgenizadas. Os animais foram avaliados aos 20, 40 e 120 dias onde foram anestesiados (cloridrato de ketamina – 0,1mL/kg de peso e cloridrato de xilazina - 0,05mL/100g de peso; via intramuscular) e tiveram a Jugular externa canulada de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). As coletas sanguíneas foram realizadas as 14:00h, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 2°C em Centrífuga (Beckman – modelo J-6M, USA) em seguida o plasma foi separado e armazenado em alíquotas.

Após as coletas sanguíneas os grupos foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Tiopentax – Cristalia® - SP-Brasil) na dose de 300mg/kg, para a indução de parada cardiorrespiratória, 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.

3.5 Parâmetros Avaliados

3.5.1 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 esquerdo.

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 ântero-posterior do fêmur tomando-se como referência a base do *trochanter tertius*.

3.5.2 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 et. al., 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, a distância de vão de apoio foi de 20 mm e a célula de carga utilizada de 2000 N com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min 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 3.

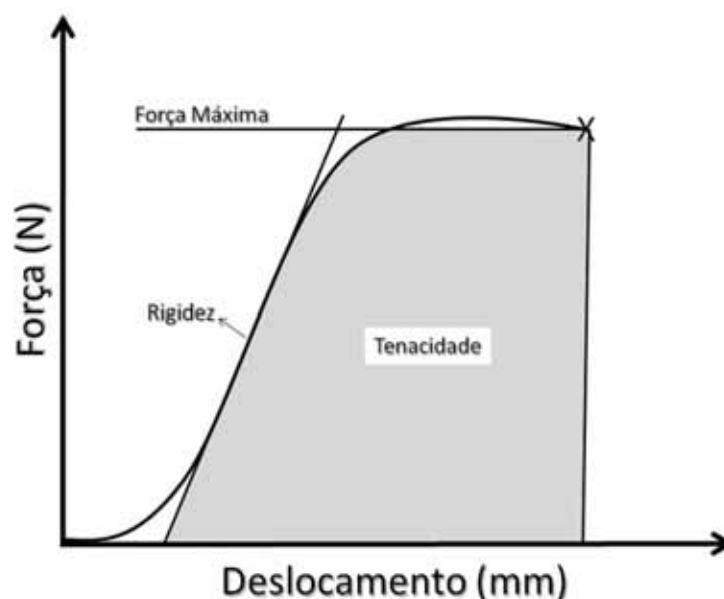


Figura 3 - Modelo de Curva Força-Deslocamento (modificado de Turner e Burr, 1993)

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.

- Tenacidade(N.mm): Corresponde a área sob a curva força-deformação até o ponto de ruptura óssea, obtida através de integração numérica.

3.5.3 Parâmetros Bioquímicos

Foram realizadas análises bioquímicas para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo.

Cálcio (mg/dL)

As determinações de cálcio plasmático foram realizadas através de método espectrofotométrico (Kit marca Labtest cat. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm com limite de detecção fotométrica de 0,06 mg/dL correspondendo a uma absorbância de 0,001.

Fósforo Plasmático (mg/dL)

As determinações de fósforo foram realizadas através do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972) modificado (kit marca Labtest cat. 12). Resumidamente, o fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de um complexo fosfomolibdato não reduzido, que será determinado em 340 nm com limite de detecção fotométrica de 0,02 mg/dL correspondendo a uma absorbância de 0,001.

Fosfatase alcalina (U/L)

A fosfatase alcalina foi determinada por método de Roy (1970) modificado (Kit da marca Labtest Cat. 40), através de reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato com sensibilidade no ensaio de 2,4 U/L.

3.5.4 Radioimunoensaios

Leptina (ng/dL)

A concentração de leptina no plasma foi determinada através do método de radioimunoensaio, sendo utilizado o Rat leptin RIA kit 250 tubes (Cat. # RL-83K – MILLIPORE - USA). Resumidamente, o princípio do método baseia-se na competição, para a ligação com o anticorpo anti-leptina e leptina marcada radioativamente. A radioatividade no precipitado é determinada com o auxílio de um contador gamma (Packard Cobra II Gamma Counter, USA) pertencente ao Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os valores foram calculados utilizando-se uma curva padrão de leptina de rato, sendo expressos em ng/ml.

Corticosterona (ug/dL)

A corticosterona plasmática foi determinada pelo método de Vecsei *et al.* (1979), que utiliza extração do esteróide com etanol. Utiliza-se um anticorpo anti-corticosterona (Ab-cort-17984), preparado em coelhos, com o Hormônio conjugado à albumina bovina. A corticosterona [1,2-3(H)] (Nem England Nuclear) é utilizada como hormônio marcado. Na separação das frações livre e ligada, utilizamos solução de carvão-dextran 0,5/0,05%, respectivamente. A radioatividade no precipitado é determinada com o auxílio de um contador beta (LS 6500 – Beckman, Beckmann Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) pertencente ao Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

4.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism (versão 5.0) e expressas em médias±EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (one-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 Parâmetros Biométricos

As alterações causadas pelo castração e androgenização neonatal sobre a massa corporal e crescimento dos fêmures foram analisadas. Os valores estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros Biométricos.

Idade	Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
		Machos sham-castrados	Machos castrados	Fêmeas controle	Fêmeas androgenizadas
20 dias	Massa Corporal (g)	52.50±4.10 ^d	54.13±11.37 ^d	51.00±1.80 ^d	69.50±4.20
	Comprimento do Fêmur (mm)	19.28±0.40 ^d	19.28±0.40 ^d	20.36±0.28	20.89±0.18
	Espessura do Fêmur (mm)	2.77±0.04	2.40±0.09 ^{a,c,d}	2.67±0.03	2.75±0.03
40 dias	Massa Corporal (g)	140.30±14.08 ^d	116.10±6.10 ^{a,d}	118.00±5.01 ^{a,d}	172.00±29.12
	Comprimento do Fêmur (mm)	26.38±0.16	27.07±0.45	25.60±0.20 ^{b,d}	26.86±0.26
	Espessura do Fêmur (mm)	3.44±0.04	3.56±0.06	3.39±0.08	3.55±0.03
120 dias	Massa Corporal (g)	341.80±24.57	284.00±15.96 ^{a,c,d}	319.00±28.16	330.00±17.86
	Comprimento do Fêmur (mm)	39.54±0.26	36.84±0.35 ^a	34.66±0.31 ^{a,b,d}	36.38±0.15 ^a
	Espessura do Fêmur (mm)	4.57±0.20	4.33±0.12	3.63±0.03 ^{a,b}	4.00±0.07 ^a

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$.

^a $p < 0.05$ VS. Machos sham-castrados;

^b $p < 0.05$ VS. Machos castrados;

^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle;

^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas androgenizadas.

5.1.1 Massa Corporal

Ao analisarmos a massa corporal dos animais, verificou-se que aos 20 dias de idade, fêmeas androgenizadas apresentaram massa corporal estatisticamente maior em relação aos demais grupos. Aos 40 dias fêmeas androgenizadas eram mais pesadas em relação aos demais grupos e machos sham-castrados mais pesados que machos castrados e fêmeas controle. Aos 120 dias todos os grupos apresentaram massa corporal maior que machos castrados (Figura 4 - Painel A).

5.1.2 Comprimento e Espessura dos Fêmures

Os resultados mostram que aos 20 dias de idade, as fêmeas androgenizadas apresentaram aumento significativo do comprimento do fêmur quando comparados aos machos sham-castrados e castrados. Em relação a espessura, os machos castrados apresentaram redução quando comparado aos demais grupos. Ao redor da puberdade (40 dias) fêmeas controle apresentaram fêmures menores quando comparados as fêmeas androgenizadas e machos castrados, e a espessura não foi diferente entre os grupos. Aos 120 dias todos os grupos apresentaram fêmures menores que machos sham-castrados, e fêmeas controle também eram menores que machos castrados e fêmeas androgenizadas. Em relação a espessura, os grupos de fêmeas foram menores que os Machos sham (Figura 4 - Painel B e C).

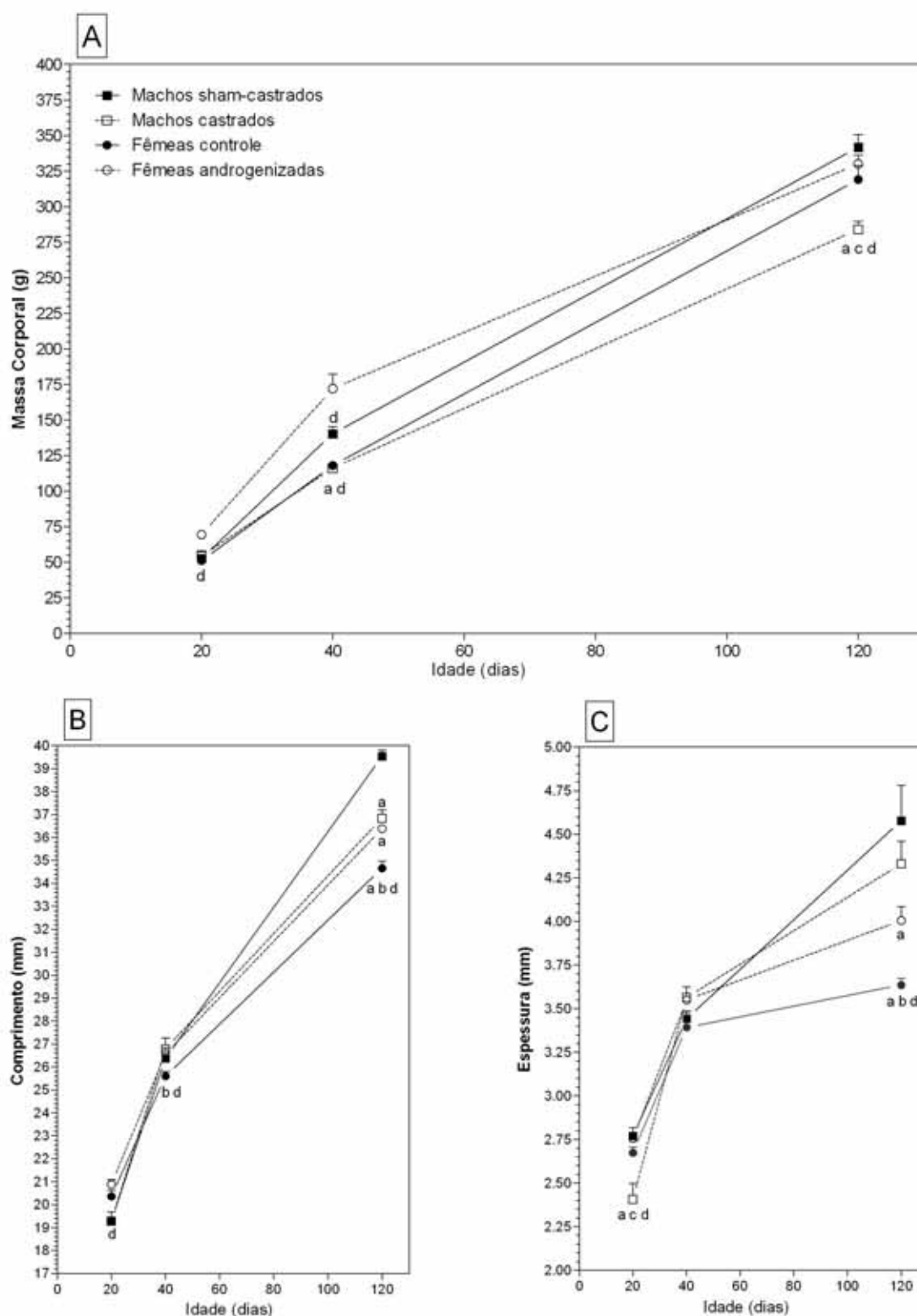


Figura 4. Parâmetros Biométricos – Painel A (acima): Massa Corporal (g) e Painel B (abaixo-esquerdo): Comprimento (mm) e Painel C (abaixo-direita): Espessura (mm). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos sham-castrados; ^b $p < 0.05$ VS. Machos castrados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas androgenizadas.

5.2 Parâmetros Biofísicos

As conseqüências estruturais causadas pelo castração e androgenização neonatal foram analisadas investigando as propriedades biofísicas dos fêmures. Os principais resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros Biofísicos.

Idade	Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
		Machos sham-castrados	Machos castrados	Fêmeas controle	Fêmeas androgenizadas
20 dias	CMO (g)	0.0265±0.0008	0.0201±0.0020 ^{a,c,d}	0.0265±0.0008	0.0276±0.0012
	Área Total (cm ²)	0.7043±0.0171	0.6560±0.0177	0.7171±0.0185	0.7168±0.0412
	DMO areal (g/cm ²)	0.0381±0.0011	0.0307±0.0027 ^{a,d}	0.0370±0.0013	0.0391±0.0014
	Força Máxima (N)	21.23±1.323	14.45±1.726 ^{a,d}	15.04±1.247 ^{a,d}	21.56±0.863
	Rigidez (N/mm)	43.95±4.693	34.70±2.396	32.480±3.197	39.56±3.526
	Tenacidade (N/mm)	27.86±0.847	24.12±1.420 ^d	21.570±1.347 ^{a,d}	31.70±1.197
40 dias	CMO (g)	0.0770±0.0027 ^b	0.0988±0.0023	0.0748±0.0047 ^b	0.0738±0.0023 ^b
	Área Total (cm ²)	1.1080±0.0096	1.1620±0.0257	1.0770±0.0172 ^b	1.0590±0.0137 ^b
	DMO areal (g/cm ²)	0.0708±0.0026 ^b	0.0868±0.0037	0.0725±0.0034 ^b	0.0687±0.0020 ^b
	Força Máxima (N)	33.46±1.305	38.44±2.282	36.23±1.480	30.42±2.079 ^b
	Rigidez (N/mm)	75.56±4.021	82.66±9.765	75.37±2.434	60.24±3.680
	Tenacidade (N/mm)	28.63±6.026	33.08±5.520	24.03±4.244	25.39±4.976
120 dias	CMO (g)	0.3764±0.0164	0.3098±0.0117 ^{a,d}	0.2949±0.0088 ^{a,d}	0.3694±0.0145
	Área Total (cm ²)	1.8910±0.0532	1.6970±0.0265 ^a	1.5290±0.0272 ^{a,b,d}	1.644±0.0201 ^a
	DMO areal (g/cm ²)	0.2053±0.0054 ^d	0.1872±0.0067 ^d	0.1980±0.0027 ^d	0.2290±0.0052
	Força Máxima (N)	142.20±8.992	126.90±2.447	95.07±3.488 ^{a,b,d}	141.90±3.393
	Rigidez (N/mm)	309.40±19.120	252.10±13.630 ^d	192.80±19.020 ^{a,b,d}	318.10±15.480
	Tenacidade (N/mm)	81.46±5.822	64.67±3.444 ^a	44.36±1.925 ^{a,b,d}	61.46±2.815 ^a

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05.

^ap<0.05 VS. Machos sham-castrados;

^bp<0.05 VS. Machos castrados;

^cp<0.05 VS. Fêmeas controle;

^dp<0.05 VS. Fêmeas androgenizadas.

5.2.1 Densitometria Óssea

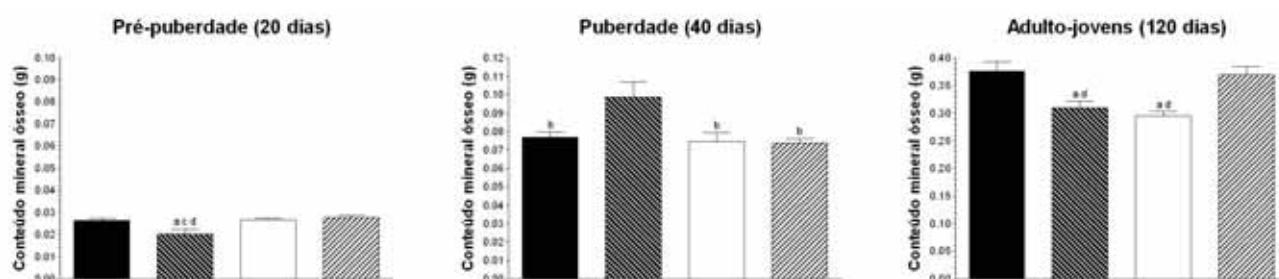
Como visto na Figura 5, aos 20 dias de idade, não houve diferença entre os grupos ao analisarmos a área total, mas machos castrados no período neonatal apresentaram menor CMO e DMO areal quando comparados aos machos sham-

castrados e fêmeas androgenizadas. Aos 40 dias de idade, os machos castrados apresentaram área total maior de ambos os grupos de fêmeas e CMO e DMO areal maior em comparação com todos os outros grupos. Aos 120 dias de idade, machos sham-castrados apresentaram maior área total que os outros grupos, e as fêmeas controle apresentaram menor área total em relação a ambos os grupos de machos. O CMO foi significativamente maior no machos sham-castrados e fêmeas androgenizadas quando comparado com os outros grupos e a DMO areal foi significativamente maior em fêmeas androgenizadas quando comparadas aos demais grupos.

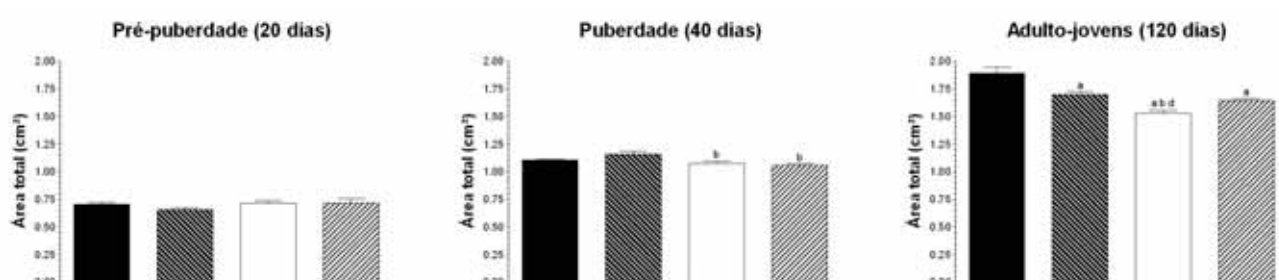
5.2.2 Ensaio Mecânico

Os resultados do teste de flexão de três pontos, que analisa as propriedades mecânicas da porção cortical dos fêmures são mostrados na Figura 6, Aos 20 dias não houve diferença estatística da rigidez entre os grupos, no entanto machos sham-castrados e fêmeas androgenizadas tinham maior tenacidade quando comparados aos outros grupos e força máxima maior quando comparados com machos castrados e fêmeas controle. Aos 40 dias não houve diferenças estatísticas da rigidez e tenacidade entre os grupos, porém os machos castrados no período neonatal apresentaram maior força máxima em comparação as fêmeas androgenizadas. Aos 120 dias as fêmeas androgenizadas demonstraram maior rigidez que os machos castrados e fêmeas controle. Ainda em relação a este parâmetro, machos sham-castrados apresentaram valores de rigidez significativamente maiores que fêmeas controle. A tenacidade foi maior em machos sham-castrados em comparação aos outros grupos, e, as fêmeas controle apresentaram valores mais baixos para tenacidade e força máxima que os demais grupos.

Painel A – Conteúdo Mineral Ósseo



Painel B - Área Total



Painel C – Densidade Mineral Óssea Areal

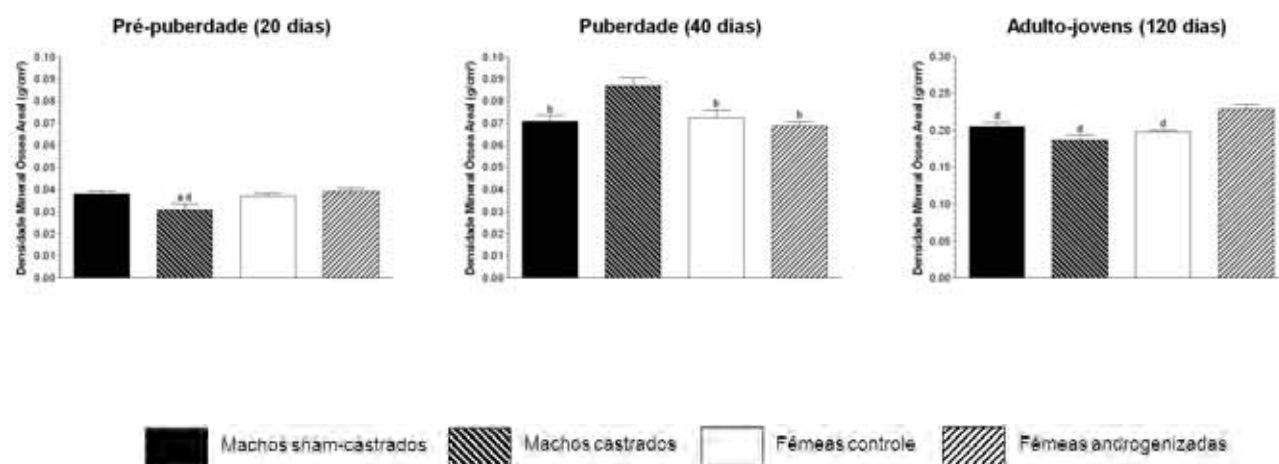
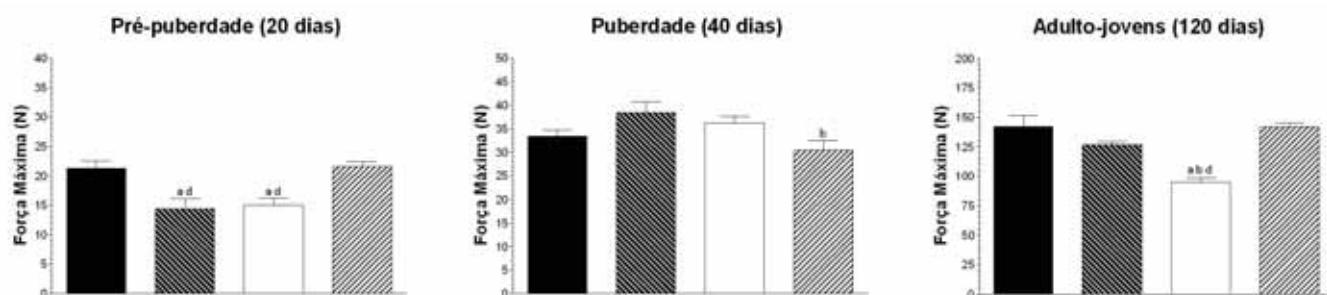
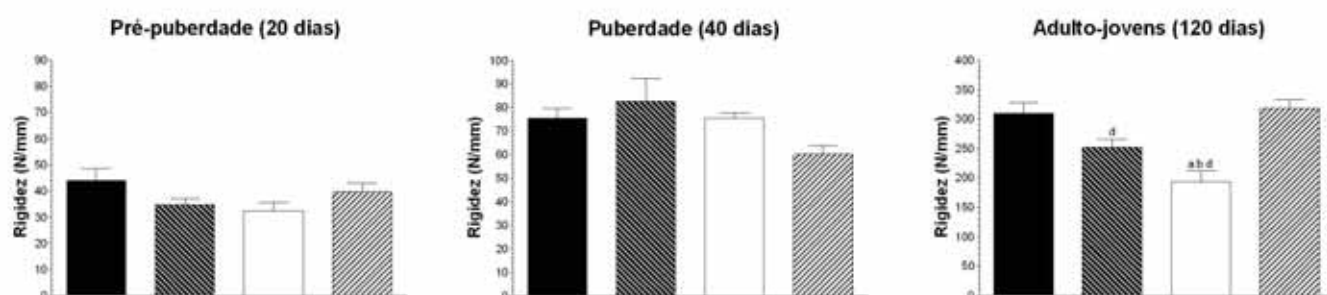


Figura 5. Densitometria Óssea – **Painel A (acima): Conteúdo Mineral Ósseo (g)**, **Painel B (centro): Área Total (cm²)** e **Painel C (abaixo): Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²)**. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos sham-castrados; ^b $p < 0.05$ VS. Machos castrados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas androgenizadas.

Painel A – Força Máxima



Painel B – Rigidez



Painel C - Tenacidade

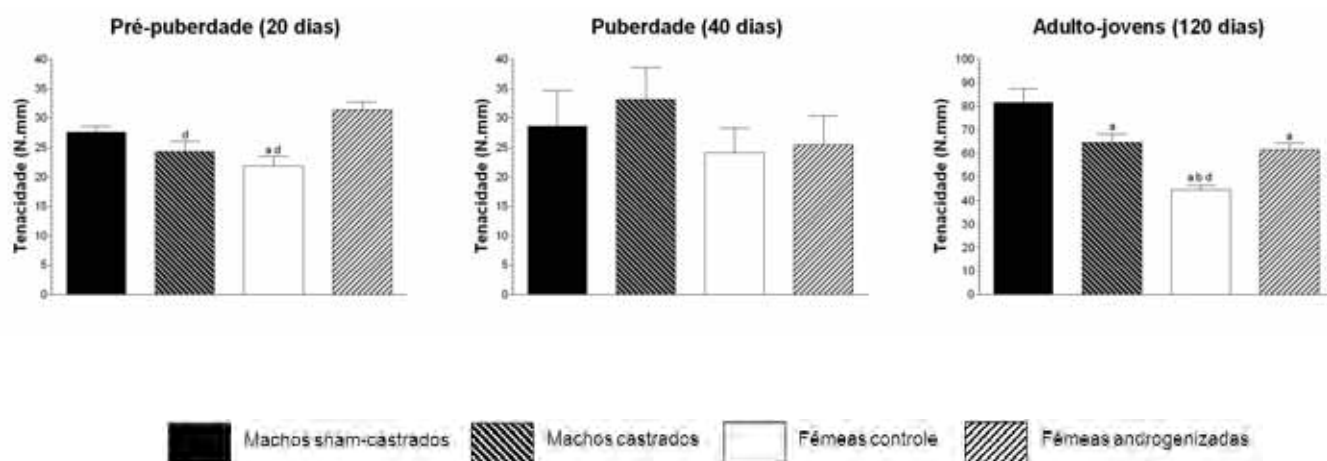


Figura 6. Ensaio Mecânico – **Painel A (acima): Força Máxima (N)**, **Painel B (centro): Rigidez (N/mm)** e **Painel C (abaixo): Tenacidade (N.mm)**. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos sham-castrados; ^b $p < 0.05$ VS. Machos castrados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas androgenizadas.

5.3 Análises Sanguíneas

As alterações causadas pelo castração e androgenização neonatal sobre os marcadores séricos do metabolismo ósseo e secreções de leptina e corticosterona foram avaliadas. Os resultados das análises sanguíneas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Radioimunoensaios e Análises Bioquímicas.

Idade	Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
		Machos Sham-castrados	Machos castrados	Fêmeas controle	Fêmeas androgenizadas
20 dias	Leptina (ng/dL)	2.46±0.19 ^d	3.13±0.28	2.62±0.14 ^d	3.48±0.19
	Corticosterona (µg/dL)	17.16±3.82	14.33±4.08	16.24±2.49	4.71±1.06 ^{a,b,c}
	Cálcio (mg/dL)	8.79±0.38	9.53±0.15	7.71±0.51	8.18±0.27
	Fósforo (mg/dL)	5.76±0.34	6.53±0.30	5.97±0.26	6.54±0.31
	Fosfatase Alcalina Total (U/L)	61.19±6.58	65.90±2.75	66.13±5.65	70.47±3.61
40 dias	Leptina (ng/dL)	2.84±0.14 ^b	3.86±0.33	2.69±0.16 ^b	2.50±0.12 ^b
	Corticosterona (µg/dL)	8.70±1.15	5.52±1.32	4.45±0.85	8.52±1.55
	Cálcio (mg/dL)	8.54±0.38	9.31±0.15	7.62±0.57 ^b	7.89±0.31 ^b
	Fósforo (mg/dL)	5.54±0.34	6.28±0.30	5.73±0.26	6.32±0.32
	Fosfatase Alcalina Total (U/L)	55.06±5.26 ^b	104.8±5.11	65.64±5.65 ^b	74.38±5.46 ^b
120 dias	Leptina (ng/dL)	4.55±1.03	5.17±0.459	5.03±0.59	4.99±0.98
	Corticosterona (µg/dL)	12.08±0.93 ^{c,d}	12.95±0.91 ^{c,d}	21.16±1.40	19.93±1.55
	Cálcio (mg/dL)	8.51±0.11	7.73±0.17 ^{a,d}	7.40±0.17 ^{a,d}	8.29±0.10
	Fósforo (mg/dL)	5.32±0.31	4.46±0.13 ^d	4.32±0.21 ^d	5.71±0.43
	Fosfatase Alcalina Total (U/L)	137.30±8.82	100.00±4.28 ^a	40.37±4.94 ^{a,b}	59.03±4.19 ^{a,b}

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05.

^ap<0.05 VS. Machos sham-castrados;

^bp<0.05 VS. Machos castrados;

^cp<0.05 VS. Fêmeas controle;

^dp<0.05 VS. Fêmeas androgenizadas.

5.3.1 Radioimunoensaios

Os resultados de radioimunoensaio para a leptina e corticosterona mostram que as fêmeas androgenizadas possuíam maiores concentrações plasmáticas de leptina, quando comparados com machos sham-castrados e fêmeas controle; e concentrações plasmáticas de corticosterona menores quando comparado com todos os grupos aos 20 dias de idade. Aos 40 dias de idade, as concentrações plasmáticas de leptina foram maiores nos machos castrados, quando comparados com outros grupos, e não foi encontrada diferença estatística nas concentrações de corticosterona. Aos 120 dias de idade, não houve diferença das concentrações de leptina entre os grupos, e ambos os grupos de machos foram estatisticamente menores em relação a corticosterona quando comparados aos grupos de fêmeas (Figura 7).

5.3.2 Ensaio Bioquímicos

Os resultados evidenciados pela figura 8, mostraram que aos 20 dias de idade, não foram encontradas diferenças em nenhum dos parâmetros analisados. Aos 40 dias de idade, não foram encontradas diferenças significativas da concentração sérica de íons fosfato, mas os machos castrados na fase neonatal apresentaram maior concentração de cálcio, quando comparado com ambos os grupos de fêmeas, e alta atividade de fosfatase alcalina total em comparação com os outros grupos. Aos 120 dias de idade, fêmeas controle e machos castrados apresentaram menor concentração de íons cálcio em comparação com os outros grupos, e menor concentração de fósforo, quando comparados a fêmeas androgenizadas. A concentração de fosfatase alcalina total foi maior em machos sham-castrados em comparação com todos os grupos e maior nos machos castrados em comparação com ambos os grupos de fêmeas.

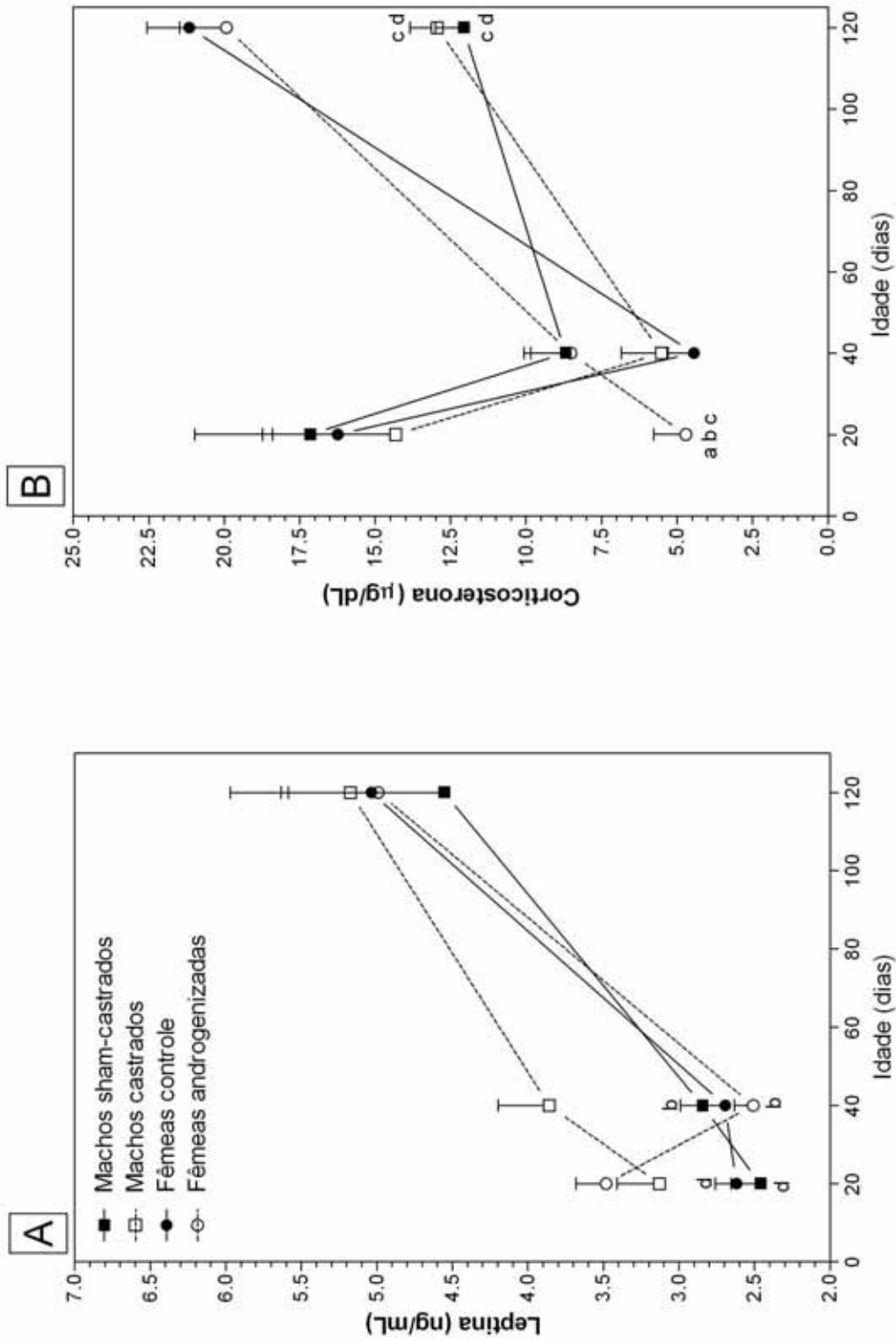
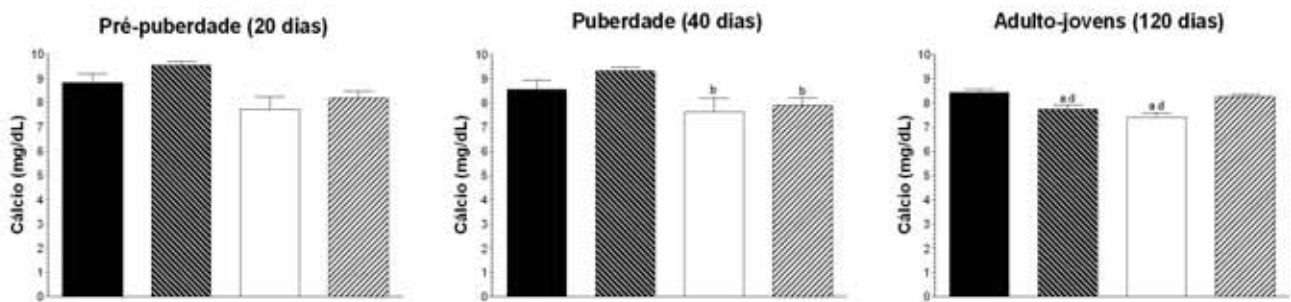
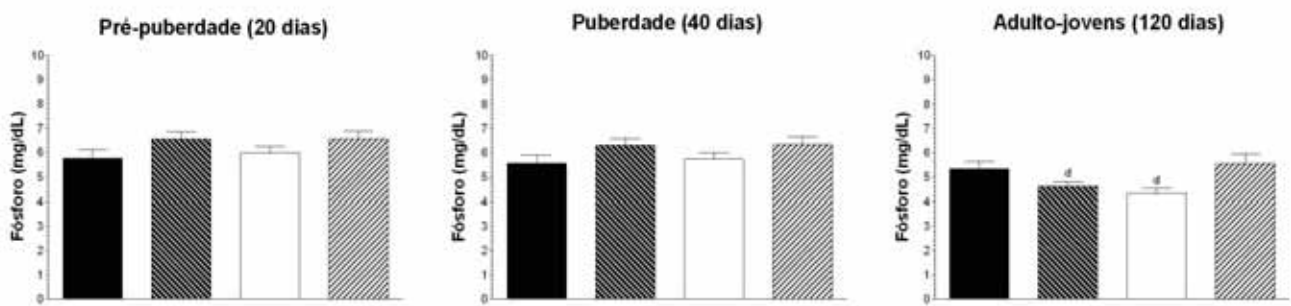


Figura 7. Radioimunoensaios para determinação das concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona – **Painel A (esquerdo): Leptina (ng/mL)** e **Painel B (direito): Corticosterona (µg/dL)**. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos sham-castrados; ^b $p < 0.05$ VS. Machos castrados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas androgenizadas.

Painel A – Cálcio



Painel B – Fósforo



Painel C – Fosfatase Alcalina

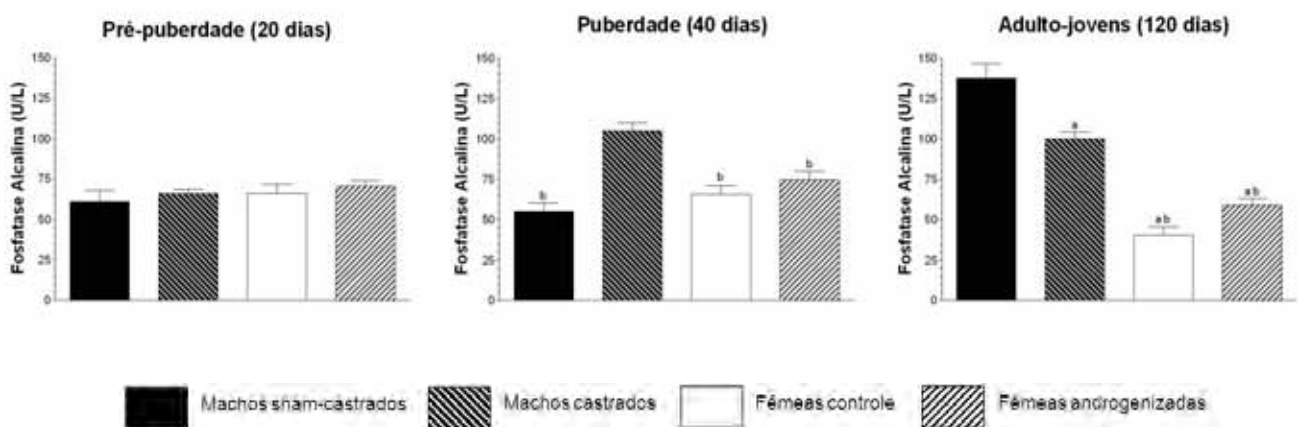


Figura 8. Análises Bioquímicas - **Painel A (acima): Cálcio (mg/dL)**, **Painel B (centro): Fósforo (mg/dL)** e **Painel C (abaixo): Fosfatase Alcalina (U/L)**. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste one-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos sham-castrados; ^b $p < 0.05$ VS. Machos castrados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle; ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas androgenizadas.

6.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou os efeitos organizacionais a longo prazo da manipulação androgênica neonatal sobre o desenvolvimento corporal, as propriedades biofísicas ósseas, bem como, concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona em ratos.

Nossos dados confirmam, que em animais controle o dimorfismo sexual esquelético surge após a puberdade, uma vez que não observamos diferenças significativas na evolução ponderal e crescimento entre machos e fêmeas controle até este período, sendo que em animais adulto-jovens, machos apresentaram massa corporal e crescimento maiores do que fêmeas controle. Estudos demonstram que esse desenvolvimento similar entre ambos os sexos no período pré-púbere ocorre devido a um ambiente hormonal semelhante, já que, o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas é relativamente quiescente, e a atividade do eixo GH/IGF-1 mantém-se baixa, porém contínua, sendo este o fator determinante no crescimento ósseo neste período (TANNER et al., 1976, TERASAWA; FERNANDEZ, 2001).

O início da puberdade foi semelhante entre machos e fêmeas, o período variou de 40 dias nas fêmeas controle a 45 dias em machos sham-castrados e foi avaliado através de observações diárias dos animais após os 30 dias de idade, até que fêmeas e machos apresentassem, respectivamente, abertura vaginal e deslocamento completo do prepúcio – indicativos do início da puberdade.

Ao analisarmos as propriedades biofísicas ósseas em animais controle no período pré-púbere e púbere, não encontramos alterações da DMO areal, e, o ensaio mecânico de flexão não demonstrou diferenças da rigidez, porém, a tenacidade foi maior em machos, este aumento, provavelmente, proporcionou um aumento da força máxima já que a mesma é determinada por uma relação inversamente proporcional entre rigidez e tenacidade (CURREY, 2002). Em animais adulto-jovens, observamos CMO e área total maiores, além de rigidez, tenacidade e força máxima aumentadas nos machos sham-castrados em relação as fêmeas controle, mas, novamente não observamos diferenças da DMO areal, evidenciando um osso mais resistente em machos. Estes resultados demonstram que a DMO 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 as fêmeas, e sugere ainda, que as diferenças encontradas na força óssea, seriam determinadas por uma geometria óssea modificada e não pela massa óssea maior, 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, TURNER et al, 1989, SCHOENAU et al., 2001). Os resultados são corroborados pelo conceito clássico de ação estimulatória dos andrógenos, especialmente a testosterona, sobre o ganho de massa corporal e desenvolvimento esqueléticos masculino, e, ações inibitórias do estrógeno, limitando o crescimento linear dos ossos longos (TURNER et al, 1989), essas diferenças determinam ossos maiores e mais resistentes a fraturas em machos.

Do mesmo modo, as análises bioquímicas não apresentaram diferenças significantes até 40 dias, porém aos 120 dias machos sham-castrados apresentaram concentrações plasmáticas de cálcio e fosfatase alcalina total maiores que fêmeas controle, o que sugere uma atividade osteoblástica aumentada com uma taxa de formação óssea maior em machos.

As concentrações plasmáticas de corticosterona não apresentaram diferenças estatísticas até a puberdade, entretanto em adulto-jovens observamos um padrão dimórfico da secreção do hormônio, onde, fêmeas controle apresentaram concentrações plasmáticas maiores que os machos sham-castrados. Segundo a literatura, esta resposta dimórfica pode ser atribuída, em parte, aos efeitos estimulatórios e inibitórios exercidos, respectivamente pelo estradiol e testosterona sobre as adrenais (CRITCHLOW et al., 1963, KITAY, 1961).

Em relação a leptina, embora evidências indicam que quando comparados na mesma idade, machos apresentam concentrações plasmáticas maiores que fêmeas (LANDT et al., 1998, PINILLA et al., 1999), em nosso estudo não encontramos diferenças estatísticas entre machos e fêmeas controles em todos os períodos analisados.

Os resultados do presente trabalho evidenciam ainda que distúrbios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas resultam em alterações no desenvolvimento esquelético e que essas diferenças ocorrem de maneira tempo-dependente, sendo que mudanças físicas mais profundas em ambos os sexos, surgem quando a

insuficiência gonadal é determinada ao redor do nascimento, fase crítica de diferenciação sexual cerebral em ratos.

Essas alterações podem ser observadas em fêmeas androgenizadas no período neonatal, que segundo Siddiqui e Gilmore (1988), apresentam puberdade tardia, sem concentrações detectáveis de hormônio luteinizante no plasma, além de atrofia ovariana sem presença de corpos lúteos. Em nosso estudo, esses animais não apresentaram abertura vaginal, confirmando os resultados relacionados ao retardo do início da puberdade encontrados por Siddiqui e Gilmore (1988) entretanto, a androgenização neonatal determinou fêmures maiores nestes animais quando comparados a fêmeas controle durante todo o período avaliado. A massa corporal também foi maior até os 40 dias, sendo no entanto, semelhantes na fase adulta. O aumento da massa corporal semelhante aos machos controle observado em nosso estudo até os 40 dias é confirmado por dados de Perelló et al. (2003), demonstrando que a androgenização aumenta a massa corporal e tecido adiposo das fêmeas tratadas levando a um padrão masculino de desenvolvimento.

Diferenças em relação ao CMO e DMO areal foram encontradas apenas nas fêmeas adulto-jovens, revelando um aumento destes parâmetros em fêmeas androgenizadas. A androgenização também alterou a qualidade óssea analisada através do ensaio mecânico, evidenciando um aumento da força máxima nesses animais. A ausência de atividade ovariana sugere, em parte, o crescimento contínuo do fêmur e a resposta masculinizada nos testes mecânicos dos fêmures, determinado possivelmente, por uma aposição periosteal continuada na ausência do efeito inibitório causado pelo estrogênio após a puberdade (BOUILLON et al., 2004, CALLEWAERT et al., 2010a).

As concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo também foram diferentes apenas aos 120 dias, porém sem diferenças da atividade da enzima fosfatase alcalina. A exposição das fêmeas aos andrógenos durante a fase neonatal determinou ainda, mudanças nos hormônios leptina e corticosterona durante a pré-puberdade. No presente estudo um aumento da concentração plasmática de leptina e diminuição na concentração de corticosterona foram demonstrados quando comparado aos demais grupos. Estes resultados podem ter sido influenciados por um *cross-linking* dos dois hormônios com ações inibitórias da leptina sobre a liberação do hormônio liberador de corticotropina, determinando uma atenuação da resposta secretória de corticosterona (HEIMAN et al., 1997).

Já em machos, a ausência da testosterona durante a fase crítica de diferenciação sexual caracterizou feminização do desenvolvimento corporal, com redução do ganho de massa corporal devido à falta de andrógenos (WATANOBE; HABU, 2003). Entretanto, o crescimento do fêmur foi normal até 40 dias, só apresentando tamanho e espessura menores que seus controles na fase adulta, este resultado sugere que durante a fase pré-púbere a testosterona não é a principal responsável pelo desenvolvimento esquelético em machos (CALLEWAERT et al., 2010b), porém após a puberdade esse crescimento não pode ser sustentado devido a ausência do hormônio masculino. Trabalhos em humanos demonstram resultados semelhantes, já que meninos com hipogonadismo hipogonadotrófico podem apresentar crescimento normal ou elevado para a idade até o período puberal. (BRITO et al., 2005).

Durante o período pré-púbere e em machos adulto-jovens, o hipogonadismo determinou um CMO e a DMO areal menores, mas, de maneira interessante aos 40 dias machos castrados apresentaram CMO e DMO areal maiores que seus controles, as análises bioquímicas confirmam o perfil estabelecido nestes animais, pois não encontramos diferenças das concentrações de cálcio e fósforo até 40 dias, mas a fosfatase alcalina estava aumentada nos machos hipogonádicos, sugerindo atividade de mineralização óssea elevada neste período, porém esses valores não são mantidos na fase adulta. As avaliações nos fêmures demonstraram fragilidade óssea, com tenacidade e força máxima reduzidas em todas as fases comparados com machos sham-castrados. Nossos dados são confirmados por estudos que demonstraram redução de DMO areal, e a redução da aposição periosteal determinando um osso menor, com um afinamento da região cortical em meninos com puberdade tardia (BERTELLONI et al., 1998, FINKELSTEIN et al., 1992, FINKELSTEIN et al., 1996).

Os resultados dos radioimunoensaios para corticosterona e leptina demonstraram que, as concentrações plasmáticas de corticosterona não diferiram em comparação com machos sham-castrados em todos os períodos estudados, já as concentrações plasmáticas de leptina foram significativamente maiores aos 40 dias de idade em relação aos machos sham-castrados. Estes resultados sugerem que a ausência de testosterona na fase neonatal pode causar alterações da aquisição do fenótipo masculino relacionado a menores concentrações plasmáticas de leptina em machos controle nesse período, e isto ocorreria independentemente

do peso corporal e tecido adiposo, uma vez que esses parâmetros foram reduzidos nesses animais, além disso, essas diferenças não persistem na idade adulta. (JOCKENHÖVEL et al., 1997, WATANOBE; HABU, 2003). Os resultados do presente estudo também evidenciam que as concentrações plasmáticas de corticosterona não foram diferentes entre machos castrados no período neonatal em comparação com machos sham-castrados, sugerindo que, além de as ações da testosterona, outros mecanismos regulam este padrão hormonal dimórfico de secreção.

Tomados em conjunto, nossos dados demonstram que a testosterona é fundamental na construção do fenótipo adulto masculino, e que o hipogonadismo hipotalâmico determina alterações importantes em machos durante todo o desenvolvimento, pois nestes animais não observamos um estirão de crescimento após a puberdade como visualizado em machos sham-castrados (VERDONCK et al., 1998), além de apresentarem um esqueleto menor e mais frágil que seus controles. Os resultados sugerem ainda, que a castração neonatal resulta em uma facilitação temporária da secreção de leptina e, a presença ou ausência de andrógenos na fase neonatal representam uma das covariáveis que modulam a variação dimórfica de secreção de leptina.

7.0 CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos dados mostram que a manipulação do ambiente androgênico durante o período neonatal causam modificações em longo prazo no desenvolvimento ósseo em ambos os sexos. Entretanto, mais estudos deverão ser realizados, principalmente com idades mais avançadas, na tentativa de elucidar como essas alterações no início da vida determinam modificações das propriedades biomecânicas e celulares relacionadas ao envelhecimento.

Ressaltamos ainda que a androgenização e castração neonatal são bons modelos de estudo relacionados ao hipogonadismo hipotalâmico, pois atuam na fase crítica de diferenciação do sistema nervoso central dos ratos e não com castrações nos períodos ao redor da puberdade, onde o cérebro já está diferenciado, proporcionando um ambiente hormonal semelhante ao encontrado neste distúrbio neuroendócrino que atinge uma parcela da população mundial, possibilitando ainda, um amplo campo de pesquisa em relação ao dimorfismo sexual. Estes resultados fornecem uma nova visão sobre a complexidade dinâmica da homeostase da massa óssea e a compreensão desses mecanismos pode permitir que novas terapias para a saúde óssea em homens e mulheres com hipogonadismo hipotalâmico e puberdade tardia possam ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

BARRACLOUGH CA, GORSKI AR. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. **Endocrinology**, 68:68-79, 1961.

BERTELLONI S. et al. Altered bone mineral density in patients with complete androgen insensitivity syndrome. **Horm. Res.**, 50(6):309-14. 1998.

BIERING-SØRENSEN et al. Bone mineral content of the lumbar spine and lower extremities years after spinal cord lesion. **Paraplegia**, 26(5):293-301, Oct. 1988.

BOUILLON R. et al. Estrogens are essential for male pubertal periosteal bone expansion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 89(12):6025-9, 2004.

BRITO V. N., MONTEIRO K. C., LATRONICO A. C. Alterações Neuroendócrinas da Puberdade. In: ANTUNES-RODRIGUES J. et al. **Neuroendocrinologia Básica Aplicada**; São Paulo; Ed. Guanabara Koogan, pg. 355-65, 2005.

CALLEWAERT F. et al. Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor-alpha. **FASEB J.**, 23(1):232-40, Jan 2009.

CALLEWAERT F.; BOONEN S.; VANDERSCHUEREN D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. **Trends Endocrinol. Metab.**, 21(2):89-95, 2010a.

CALLEWAERT F. et al. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. **J. Endocrinol.**, 207(2):127-34, Nov 2010b.

CHEVALLEY T. et al. The influence of pubertal timing on bone mass acquisition: a predetermined trajectory detectable five years before menarche. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 94: 3424–3431, 2009.

CRITCHLOW V. et al. Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. **Am. J. Physiol.**, 205(5):807-15, 1963.

CURREY J. D.. Bones. In: **Structure and Mechanics**. Princeton, UP, New Jersey, pp. 1– 380, 2002.

DALY J. A.; ERTINGSHAUSEN G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". **Clin. Chem.**, 18(3):263-5, Mar 1972.

DEMIREL G. et al. Osteoporosis after spinal cord injury. **Spinal Cord.**, 36(12):822-5, Dec 1998.

DUAN Y. et al. Structural and biomechanical basis of sexual dimorphism in femoral neck fragility has its origins in growth and aging. **J. Bone Miner. Res.**, 18, 1766-1774, 2003.

DUBEY A. K., PLANT T. M. A suppression of gonadotropin secretion by cortisol in castrated male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) mediated by the interruption of

hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release. **Biol Reprod.**, 33(2):423-31, Sep 1985.

FINKELSTEIN J.S. ET AL. An Osteopenia in men with a history of delayed puberty. **N. Engl. J. Med.** 27;326(9):600-4, Feb 1992.

FINKELSTEIN J.S.; KLIBANSKI A.; NEER R. M. A longitudinal evaluation of bone mineral density in adult men with histories of delayed puberty. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 81(3):1152-5, Mar 1996.

GARN S. The earlier gain and later loss of cortical bone. In: THOMAS C. C. **Nutritional Perspective.** Springfield Ill, pp 3–120, 1970.

GILSANZ V. et al. Differential effect of gender on the sizes of the bones in the axial and appendicular skeletons. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 82(5):1603-7, May 1997.

GORDON J. H. et al. Regional catecholamine content in the rat brain: sex difference and correlation with motor activity. **Neuropharmacology**, 13:129-137, 1974.

GORSKI R. A. et al. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. **Brain Res.**, 148: 333-46, 1978.

GORSKI R. A. et al. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **J. Comp. Neurol.**, 193: 529-39, 1980.

GORSKI R. A. Sexual Differentiation of the Endocrine Brain and its Control. In: MOTTA M. ***Brain Endocrinology – Second Edition***. New York: Raven Press, p. 71-104, 1991.

GRABER J. A.; BROOKS-GUNN J.; WARREN M. P. The antecedents of menarcheal age: heredity, family environment, and stressful life events. **Child Dev**, 66(2):346-59, Apr 1995.

GRUMBACH M. M. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. **J Pediatr Endocrinol Metab.**,13 Suppl 6:1439-55, 2000.

GRUMBACH M. M.; AUCHUS R. J. Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. **J Clin Endocrinol Metab.**,84(12):4677-94, Dec 1999.

HARMS P. G.; OJEDA S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J. Appl. Physiol.**, Vol.36, No.3, 1974.

HEIMAN M. L. et al. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. **Endocrinology**, 138:1358–1363, 1997.

JINGAMI H. Effects of adrenalectomy and dexamethasone administration on the level of prepro-corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamus and adrenocorticotropin/beta-lipotropin precursor mRNA in the pituitary in rats. **Endocrinology**. 117(4):1314-20 Oct 1985.

JOCKENHÖVEL F. et al. Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 82(8):2510-3, 1997.

KIM B. et al. The Structural and Hormonal Basis of Sex Differences in Peak Appendicular Bone Strength in Rats. **J. Bone Miner. Res.**, 18:150 –155, 2003.

KITAY J.I. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. **Endocrinology**, 68:818-24, 1961.

LANDT M. et al. Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans. **Clin. Chem.**, 44(3):565-70, 1998.

LEE, P. A. Definition of puberty. In: . BECKER J. B. **Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism**. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 822–830, 1995.

MACLUSKY NJ, NAFTOLIN F, LERANTH C. Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. **Brain Res.**, 26;439(1-2):391-5, Jan 1988.

MCCARTHY, M. M. Hormones and the developing brain. **Advances in Molecular and Cell Biology**, Vol. 34, pages 259–279, 2004.

MCCARTHY, M. M. How it's Made: Organisational Effects of Hormones on the developing brain. **J. Neuroendocrinology**, 22, 736–742, 2010.

MCEWEN B.S. et al. Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. **Brain Res.**, 96; 400–406, 1975.

MOSLEY J. R. Osteoporosis and bone functional adaptation: Mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. **J. Rehabil. Res. Dev.**, 37:189-99, 2000.

ORENSANZ L. M. et al. Sex differences in alpha adrenergic receptors in the rat brain. **Neuroscience Lett.**, 30: 275-278, 1982.

PANAGIOTAROPOULOS T. et al. Effect of Neonatal Handling and Sex on Basal and Chronic Stress-Induced Corticosterone and Leptin Secretion. **Neuroendocrinology**, 79:109–118, 2004.

PARK K. H. A concomitant decrease in cortical and trabecular bone mass in isolated hypogonadotropic hypogonadism and gonadal digenesis. **Yonsei Med J.**, 40(5):444-9, Oct 1999.

PERELLÓ M. et al. Neonatal hypothalamic androgenization in the female rat induces changes in peripheral insulin sensitivity and adiposity function at adulthood. **Neuroendocrinol. Lett.**, 24(3-4):241-8, 2003.

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

PINILLA L. et al. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. **Eur. J. Endocrinol.**, 140(5):468-73, May 1999.

RIGGS B. L.; KHOSLA S.; MELTON L.J. 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocr. Rev.**, 23(3):279-302, Jun 2002.

RINGSTROM S. J., SCHWARTZ N. B. Cortisol suppresses the LH, but not the FSH, response to gonadotropin-releasing hormone after orchidectomy. **Endocrinology**, 116(1):472-4, Jan 1985.

RIVIER C, VALE W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. **Endocrinology**, 114(3):914-21, Mar 1984.

ROY AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. **Clin. Chem.** 16(5):431-6, May 1970.

SCHOENAU E. et al. The development of bone strength at the proximal radius during childhood and adolescence. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 86(2):613-8, Feb 2001.

SEEMAN E. From density to structure: growing up and growing old on the surfaces of bone. **J. Bone Miner. Res.**, 12:1–13, 1997.

SIDDIQUI A.; GILMORE D. P. Regional differences in the catecholamine content of the rat brain: effects of neonatal castration and androgenization. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, 118(4):483-94, Aug 1988.

SPIEGELMAN B. M.; FLIER J. S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. **Cell**, 1;87(3):377-89, Nov 1996.

TANNER J. M.; WHITEHOUSE R. H.; HUGHES P. C. R. 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. **J. Pediatr.** 89:1000, 1976.

TERASAWA E.; FERNANDEZ D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocr. Rev.**, 22(1), 111-51, 2001.

TURNER R. T. et al. Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. **J. Bone Miner. Res.**, 4(4), 557-63, Aug 1989.

TURNER R. T.; WAKLEY G. K.; HANNON K. S. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. **J. Orthop. Res.**;8(4):612-7, Jul 1990.

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

VACCARI A. Sexual differentiation of monoamine neurotransmitters. In: Parves H; Parves S. **Biogenic Amines in Development** Elsevier, Amsterdam, North Holland, pp 327-352, 1980.

VANDERSCHUEREN D. et al. Androgens and bone. **Endocr. Rev.**, 25(3):389-425, Jun 2004.

VECSEI P. Glucocorticoids: cortical, corticosterone and compounds. In. JAFFE B.M., BERHMAN H. R. **Methods of hormone radioimmunoassay**. New York, Academic Press, 39: 767-792, 1979.

VERDONCK A. et al. Effect of testosterone replacement after neonatal castration on craniofacial growth in rats. **Arch. Oral Biol.**, 43(7):551-7, 1998.

VIAU V. Functional Cross-Talk Between the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Adrenal Axes. **J. Neuroendocrinol.**, 14:506–513, 2002.

WATANOBE H.; HABU S. Manipulation of neonatal gonadal steroid milieu and leptin secretion in later life in male and female rats. **Regul. Pept.**, 28:110(3), 219-24, 2003.

WU, F. C. W. et al. Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in the human male: a study using deconvolution analysis and ultrasensitive immunofluorometric assay. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 81: 1798–1805, 1996.

YINGLING V. R.; KHANEJA A. Short-term delay of puberty causes a transient reduction in bone strength in growing female rats. **Bone**, 38(1):67-73, 2006.

YINGLING V. R. et al. The effect of a short-term delay of puberty on trabecular bone mass and structure in female rats: a texture-based and histomorphometric analysis. **Bone**, 40(2):419-24, Feb 2007.

YINGLING V. R.; TAYLOR G. Delayed pubertal development by hypothalamic suppression causes an increase in periosteal modeling but a reduction in bone strength in growing female rats. **Bone**, 42(6):1137-43, 2008.

YU W. H., et al. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 94, pp. 1023-1028, Feb 1997.

ANEXO A – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"OS EFEITOS DA CASTRAÇÃO E ANDROGENIZAÇÃO NEONATAL SOBRE A FORMAÇÃO ÓSSEA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LEPTINA EM RATOS"** sob responsabilidade do **Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro** e colaboração de **Wagner Garcez de Mello** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 12/01/2009 de acordo com o protocolo 2008-002331.

Araçatuba, 23 de Abril de 2009

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