

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio De Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia – *Campus* de Araçatuba



Lucas Perez Lahr

“Estudos dos efeitos do estrógeno sobre a concentração plasmática de Ca^{2+} , P e atividade de ALP de ratas ovariectomizadas”

Araçatuba

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia – Campus de Araçatuba

Lucas Perez Lahr

“Estudos dos efeitos do estrógeno sobre a concentração plasmática de Ca^{2+} , P e atividade de ALP 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”

Orientadora: Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles

Araçatuba

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio De Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia – Campus de Araçatuba

Lucas Perez Lahr

“Estudos dos efeitos do estrógeno sobre a concentração plasmática de Ca^{2+} , P e atividade de ALP 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”

Aprovado em: 30/09/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Presidente

Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Membro Titular

Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Membro Titular

Dedicat3ria

Aos meus pais Antonio Carlos de Jesus Lahr e Sonia Regina Perez Lahr pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida, e por terem aceito se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

À minha irmã Natália Perez Lahr pela amizade e companheirismo durante todos esses anos.

Amo vocês!

Agradecimientos

Agradeço a princípio a Deus, que me permitiu a inteligência e o privilégio que me foi dado em compartilhar tamanha experiência e, ao freqüentar este curso, perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade, de minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles, pelas orientações precisas em todos os momentos solicitados e pela paciência, nos proporcionando um aprendizado tanto profissional como pessoal.

Aos profs. Kikue Takebayashi Sasaki e Alberto Carlos Botazzo Delbem, pela ajuda indispensável para a realização do trabalho.

Aos meus amigos Nathália Tuany Duarte, Lyvia Fernandes Prates e Robert Bueno, pelo convívio fraternal e familiar, sendo de extrema importância para a realização deste trabalho.

Ao amigo e companheiro André Fattori, por estar ao meu lado nas melhores e piores horas, sempre disposto a ajudar.

À instituição UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, e aos idealizadores, coordenadores e funcionários que a compõe.

Epígrafe

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar." (Anatole France)

Resumo

Lahr L.P.; Dornelles R.C.M. **Estudos dos efeitos do estrógeno sobre a concentração plasmática de Cálcio (Ca^{2+}), Fósforo (P) e atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) de ratas ovariectomizadas.** (Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Estudos dos efeitos do estradiol sobre a concentração plasmática de Cálcio (Ca^{2+}), Fósforo (P) e atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) de ratas ovariectomizadas.

RESUMO

O estradiol 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, a depleção de estradiol está associada com várias doenças, que incluem a reabsorção óssea. Atualmente, a tentativa da medicina é fazer a reposição hormonal, mas sem causar maiores danos ao organismo. O objetivo do presente estudo foi definir sistematicamente o efeito dose-resposta de estradiol no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. Ratas Wistar (6 meses) foram selecionadas após análise do ciclo estral, e ovariectomizadas (OVX). Após 15 dias receberam pellets contendo óleo de milho ou estrogênio com 100, 200 e 300 μ g 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 posteriores determinações bioquímicas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e estradiol. Os fêmures foram retirados para realização de calcinação em mufla e dosagem de cálcio, fósforo e fluoreto. A concentração plasmática de cálcio foi semelhante entre os grupos. O fósforo foi significativamente menor no grupo de animais OVX tratados com 100 μ g de estradiol e a fosfatase alcalina foi menor nos animais que receberam 200 μ g de estradiol. A concentração de

cálcio e fósforo na cinza mineral dos ossos foi semelhante entre os grupos. Já a concentração de fluoreto na cinza foi menor nos animais que receberam 300 μg de estradiol. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o grupo de ratas OVX tratadas com 100 μg de estradiol apresentou melhor mineralização óssea.

Palavras chave: Osteoporose. Estrógeno. Ovariectomia.

Abstract

Lahr L.P.; Dornelles R.C.M. **Studies of the estrogen effects on plasma concentration of Calcium (Ca^{2+}), Phosphorus (P) and Alkaline Phosphatase (ALP) activity in ovariectomized rats.** (Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Studies of the estrogen effects on plasma concentration of Calcium (Ca^{2+}), Phosphorus (P) and Alkaline Phosphatase (ALP) activity in 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 menopause, the deficiency of estrogen production is associated to various diseases, which includes bone resorption. Today, the medicine attempt is to make the hormone replacement, but without causing further damage to the body. The objective of this study was to define sistematically the dose–response effect of estrogen on the bone of ovariectomized rats. Wistar rats (6 months) were selected after the analysis of estrous cycle, and ovarietomized (OVX). After 15 days, they received pellets containing corn oil or estrogen with 100, 200 and 300 μg of 17β -estrogen, during 60 days. After this period and under anesthesia (xylazine-4mg/kg; ketamine-40mg/Kg), blood was collected from the jugular vein, then the animals were sacrificed by the excess of anesthetic to remove 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 removed for carrying out the calcinations in a muffle. The plasma concentration of calcium was similar between groups. Phosphorus was significantly lower in the group of OVX animals treated with 100 μg of estrogen and alkaline phosphatase was lower in animals that received 200 μg of estrogen. The concentration of calcium and phosphorus in bone mineral ash was similar between groups. However the concentration of fluoride in the ash was lower in animals that received 300 μg of estrogen. According to the results, we can conclude that the group of OVX treated with 100 μg of estrogen showed better bone mineralization.

Key words: Osteoporosis. Estrogen. Ovariectomy.

Sumário

1. <i>Introdução</i>	10
2. <i>Objetivo</i>	13
3. <i>Materiais e métodos</i>	14
4. <i>Resultado</i>	17
5. <i>Discussão</i>	21
6. <i>Conclusão</i>	26
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	27

INTRODUÇÃO

Atualmente há número grande de pesquisas científicas envolvendo disfunções ósseas, em especial a osteoporose. O processo de reabsorção óssea está se tornando mais compreensível a cada dia. Como já se sabe, a osteoporose está relacionada, em sua maioria, às mulheres após a menopausa, quando há depleção da produção de estrógeno (Manolagas *et al.*, 2002).

A osteoporose é patologia esquelética em que a massa óssea é perdida, levando a deterioração da arquitetura óssea e aumento do risco de fratura óssea. Fraturas vertebrais e microfraturas do colo femoral comumente ocorrem e têm implicações sociais e de saúde graves para as pessoas que sofrem da doença (Bandeira, 2000). Estima-se que uma em cada três mulheres e um em cada cinco homens com idade superior a 50 anos irá sofrer fratura osteoporótica (Melton *et al.*, 1989). Alguns estudos evidenciam que a existência do risco de ocorrer uma fratura osteoporótica é superior a de desenvolver câncer de mama em mulheres brancas (Cummings *et al.*, 1995).

Durante a adolescência, a densidade óssea aumenta rapidamente, atingindo o máximo em aproximadamente 10 anos após a conclusão do crescimento do esqueleto. No envelhecimento, o equilíbrio entre reabsorção e deposição torna-se negativo, porque a quantidade de reabsorção excede a deposição (Szejnfeld, 2000). Nos 10 anos seguintes à menopausa, as mulheres perdem perto de metade do seu osso esponjoso e cortical, um terço da sua massa óssea devido à perda óssea acelerada causada pela depleção de estrógeno. Em contraste, os homens perdem cerca de 30% menos de massa óssea durante a sua vida. Quando este desequilíbrio torna-se clinicamente significativo, uma pessoa é diagnosticada com osteoporose.

No osso há processo contínuo de remodelação pela ação conjugada de osteoclastos (osso reabsorvido) e osteoblastos (osso formando), os quais funcionam como uma unidade básica multicelular (Frost, 1991). A osteoporose é geralmente atribuída a desequilíbrio na ação conjugada das células onde ocorre a reabsorção

óssea osteoclástica, sem combinar a formação óssea osteoblástica. Um fator que pode dar origem a esse desequilíbrio é a deficiência de estrógeno, como ocorre em mulheres pós-menopáusicas, pois tem sido demonstrado que esta deficiência afeta a atividade dos osteoclastos (Oursler, 1998). Essa disfunção metabólica ocorre porque receptores de estrógeno nos osteoclastos ativam-se com a falta de estrógeno, reagindo com o aumento da atividade dos osteoclastos. Embora haja também receptores de estrógeno nos osteoblastos, estes respondem à falta de estrógeno com a diminuição de suas atividades (Blair, 1998). Assim, durante o processo de contínua remodelação do esqueleto, há maior taxa de reabsorção do que de formação óssea. Com isso, as mulheres perdem em torno de 30 a 50 por cento do osso trabecular e 25 a 35 por cento da massa óssea cortical. A doença resulta em mais de 40 % das mulheres pós-menopáusicas sofrendo fratura óssea de punho, coluna e quadril (colo do fêmur) durante suas vidas.

No tecido ósseo, os osteoblastos são formados a partir de células mesenquimais, adipócitos e células estromais. São células produtoras de proteínas e secretam colágeno tipo I (início da mineralização). Já os osteoclastos se originam a partir de células hematopoiética de linhagem mielóide (Junqueira *et al.*, 1999). São células grandes e multinucleadas, as quais promovem a reabsorção óssea. Para a diferenciação e função dos osteoclastos, é necessária a produção de fatores (citocinas) por osteoblastos e células estromais. Os receptores da maioria dos fatores osteolíticos são encontrados em osteoblastos, não em osteoclastos (Rodan e Martin, 1981). Esses osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos ativados.

A função do estrógeno no metabolismo ósseo é de regular, nos osteoblastos, a expressão de genes que codificam o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. Aumentar a diferenciação dos osteoblastos, inibir agentes

reabsortivos como interleucinas, prostaglandinas e fator estimulador de macrófago, produzir antagonistas dos receptores para interleucinas (Compston, 2001) são outras importantes funções do estrógeno.

Essas informações evidenciam a necessidade da busca por tratamentos e terapias de prevenção eficientes que amenizem os efeitos da osteoporose sistêmica, como perda de massa óssea, perda de dentes e outros fatores desenvolvidos por essa disfunção. Tais pesquisas buscam proporcionar maior qualidade de vida à população.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi analisar e comparar as concentrações dos marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo entre os grupos experimentais de ratas Wistar (6 meses) intactas e ovariectomizadas tratadas ou não com diferentes concentrações de estradiol (100, 200 e 300 μg).

*MATERIAIS E
MÉTODOS*

Animais:

Para a realização deste trabalho, foram utilizados ratas da linhagem Wistar (6 m), mantidas em gaiolas coletivas (cinco animais/caixa) em ambiente com temperatura entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo de luz controlada (12/12 h) 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 (n^o 009436-2010).

Ciclo estral:

O esfregaço vaginal de todos os animais foi colhido para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã, segundo a técnica de Evans & Long (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico durante 15 dias. Somente foram aceitos no trabalho animais que apresentam ciclo estral regular.

Ovariectomia:

A ovariectomia (OVX) 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.).

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/O), 100, 200 ou 300 μg de 17β -estradiol (grupo OVX/E₂). Os

implantes foram mantidos durante 60 dias, sendo realizada troca, aproximadamente, a cada 30 dias.

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 foram retirados os fêmures.

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). 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. O fósforo inorgânico reage 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 comerciais, através de reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato.

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.

Fluoreto, Cálcio e Fósforo: Os fêmures limpos (descarnados) foram colocados em estufa a 90°C durante 12h. Em seguida, com a utilização de cortador de osso, foi obtido 0,5 cm do terço médio do fêmur. Essas frações de osso foram pesadas e em seguida foram colocadas em mufla a 600°C para a realização da calcinação, conforme estudos de Martin (1990). A mufla foi ligada por 15' à temperatura de 600°C e em seguida os cadinhos foram colocados e mantidos por 30'. Passado esse período, foram retirados e pesados juntamente com os ossos. Os cadinhos foram recolocados na mufla com os ossos onde permaneceram por 12h. Após este período, os cadinhos foram retirados e colocados no dessecador para esfriar. Em seguida, os cadinhos com os ossos queimados foram pesados. Com auxílio de pistilo, os ossos foram pulverizados e alíquotas de 4-5 mg foram pesadas e armazenadas em eppendorfs para a realização das dosagens da concentração de fluoreto que foi realizada pelo método de dosagem TAVES (1970), cálcio e fósforo.

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, conforme apresentado na figura 1. 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 atrofícos. Nos animais OVX pré-tratados com E₂, foi verificado a presença de células coniformes anucleadas e útero maior, quando comparado com os das ratas OVX/Óleo.

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. 2).

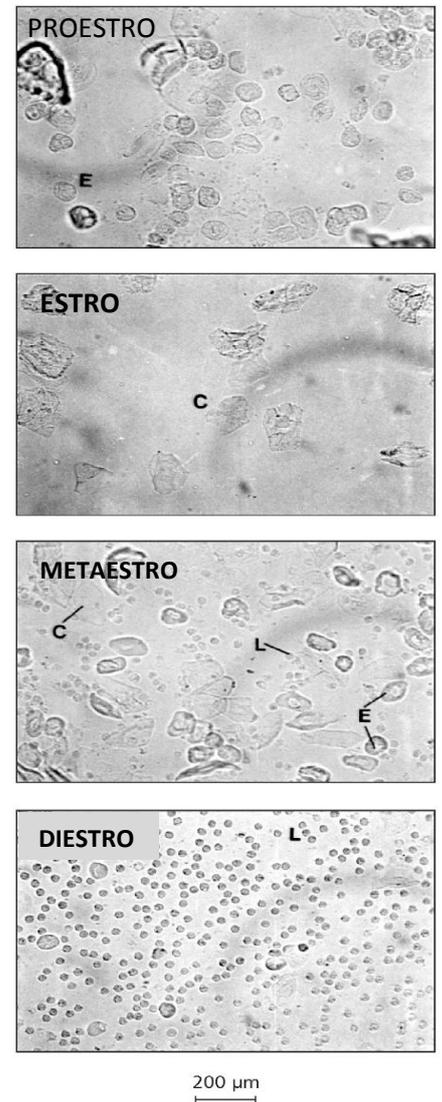


Fig. 1. Fases do Ciclo Estral de ratas Wistar. Fonte: MARCONDES FK; BIANCHI FJ; TANNO AP. *Braz. J. Biol.* V.62, 2002. L= leucócitos; E= células epiteliais/nucleadas; C= células anucleadas e cornificadas.

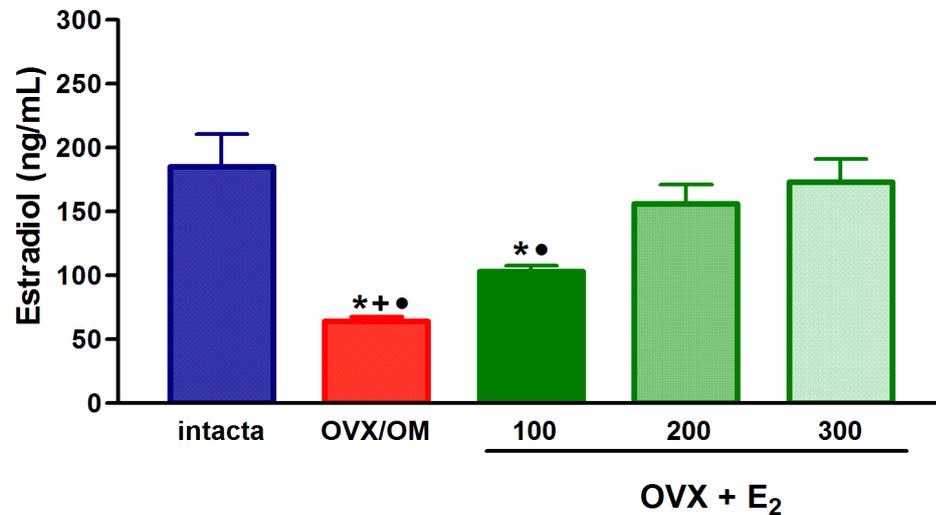


Fig. 2: Concentração plasmática de estradiol de ratas intactas, ratas OVX que receberam pellets com óleo de milho (OM), pré-tratadas com 100, 200 e 300 μg de estradiol. * $p < 0,05$ vs Intactas; + $p < 0,05$ vs 200 μg de E_2 ; • $p < 0,05$ vs 300 μg de E_2 . N= 6-8 animais/grupos.

Na figura 3 estão representados graficamente os resultados das médias e EPM da concentração plasmática de cálcio (a), fósforo (b) e fosfatase alcalina (c). Os resultados obtidos evidenciam que a OVX e o tratamento com as diferentes concentrações de estradiol não alteraram significativamente a concentração plasmática de cálcio (Fig.3a). Entretanto, o pré-tratamento com 100 μg de estradiol em ratas OVX desencadeou concentração de fósforo significativamente menor (Fig. 3b).

Entre os grupos de ratas OVXs ocorreu alteração na atividade da fosfatase alcalina. A concentração plasmática desta enzima foi significativamente menor no grupo de ratas OVX tratadas com 200 μg de estradiol (Fig 3c). O tratamento com 300 μg de estradiol teve significante redução na concentração plasmática de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo de ratas intactas.

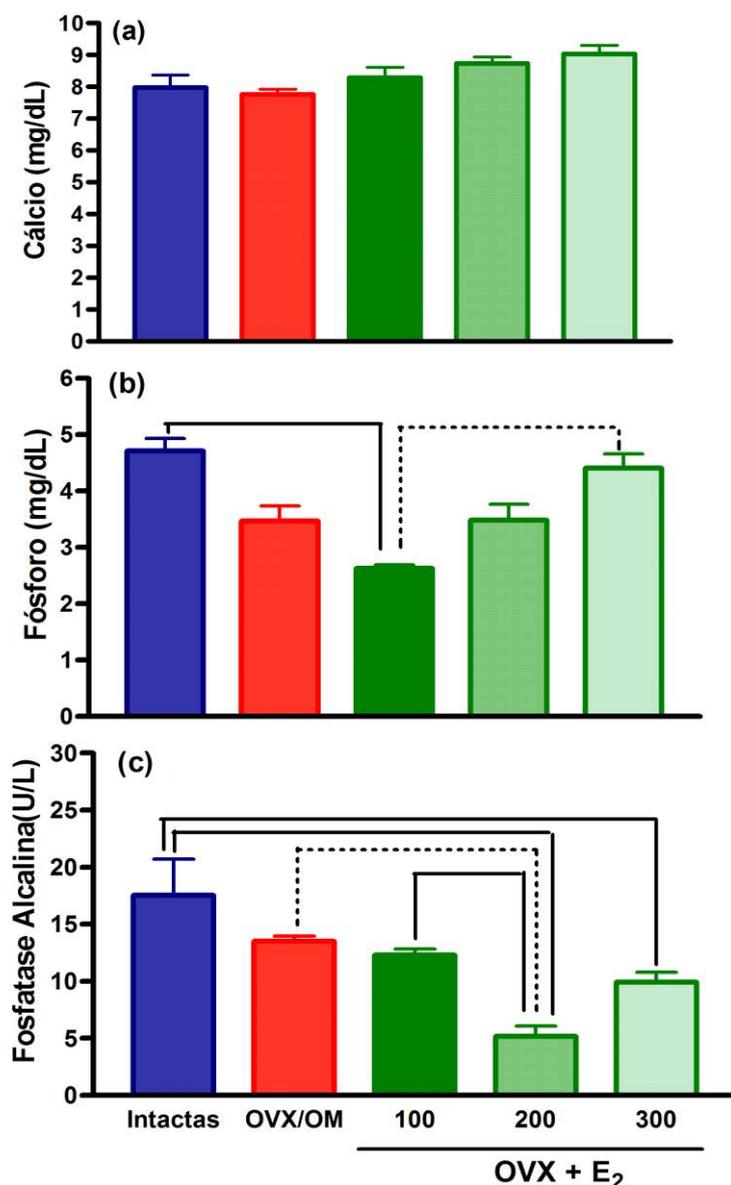


Figura 3 – Concentração plasmática de cálcio (a), fósforo (b) e fosfatase alcalina (c) de ratas intactas, OVX que receberam pellets com óleo de milho OVX - OM, OVX pré-tratadas com 100, 200 e 300 µg de estradiol. N= 6-8 ratas/grupo.

A concentração mineral de cálcio e fósforo foi semelhante entre os grupos analisados. No entanto, a concentração de fluoreto foi significativamente menor no grupo de ratas OVX tratadas com 300 µg de estradiol, quando comparado aos grupos de ratas OVXs que receberam 100 e 200 µg de estradiol e ratas intactas. Porém, a concentração de fluoreto foi semelhante entre os grupos de ratas OVX com OM e tratadas com 300 µg de estradiol (Fig. 4c).

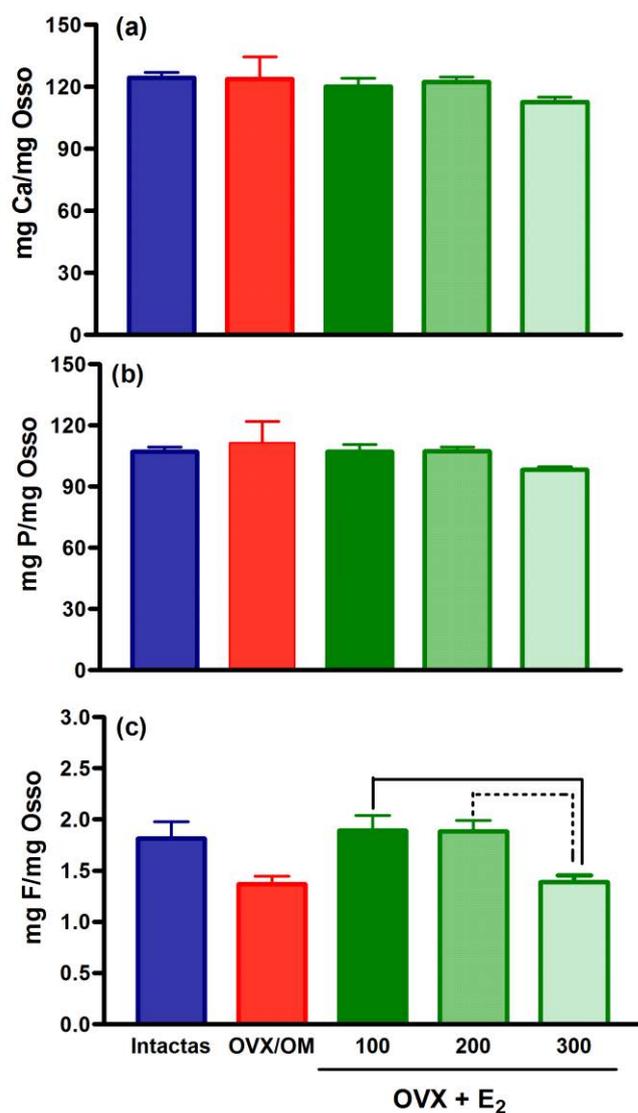


Figura 4 – Concentração mineral de cálcio (a), fósforo (b) e fluoreto (c) das cinzas do fêmur de ratas intactas, OVX que receberam pellets com óleo de milho (OVX - OM), OVX pré-tratadas com 100, 200 e 300 µg de estradiol. N= 6-8 ratas/grupo.

DISCUSSÃO

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído por população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação celular que, através de uma intrincada e muito bem coordenada sequência de eventos, regula a mobilização e deposição mineral durante a vida (Pizauro, 2002).

Os marcadores bioquímicos são elementos liberados no corpo a partir das transformações ósseas. A contagem e comparação desses elementos resultantes das atividades de formação e reabsorção têm sido de grande utilidade para monitorar as pequenas mudanças no metabolismo ósseo. Na doença osteoporose, os marcadores bioquímicos são muito importantes para se avaliar o metabolismo ósseo durante a monitoração. Eles são úteis para determinar com precisão os níveis de reabsorção óssea antes e durante o tratamento. E são também importantes, para a avaliação da eficácia do tratamento (Vieira, 1999).

O cálcio é mineral essencial na composição dos ossos. Estes são compostos de aproximadamente 70% deste mineral combinado quimicamente com outros como o fósforo. O cálcio é essencial também para a contração muscular, a transmissão dos impulsos nervosos e para a coagulação do sangue.

Noventa e nove por cento do cálcio do organismo humano encontra-se na composição dos ossos, que constituem “depósito” para preservar as funções vitais. O cálcio armazenado nos ossos pode ser mobilizado (reabsorção óssea) para manter os níveis no sangue e nos tecidos, dentro dos limites fisiológicos.

Nos resultados obtidos neste trabalho, não houve diferença significativa na concentração plasmática de cálcio entre os grupos analisados. Isso pode ocorrer devido ao fato de o organismo manter a concentração de cálcio no plasma,

presumivelmente para proteger o sistema neuromuscular e outros processos dependentes de cálcio (Pettifor *et al.*, 1981). Embora não haja diferenças significativas na concentração plasmática de cálcio entre os grupos, observa-se discreto aumento na concentração de cálcio com o respectivo aumento da concentração de estradiol administrado, corroborando com os estudos de Bolscher e colaboradores (1999), onde comprovam que a deficiência de estradiol provocada na menopausa, por exemplo, diminui a absorção intestinal de cálcio. Quando administrado o hormônio durante terapia hormonal, há nítido aumento na concentração plasmática de cálcio, devido ao aumento da absorção intestinal.

A concentração mineral de cálcio se manteve semelhante entre os grupos analisados, corroborando com a teoria de homeostase do cálcio no organismo anteriormente citada.

Os resultados obtidos na análise de fósforo plasmático mostram que houve menor concentração significativa no grupo de ratas OVX tratadas com 100 µg de estradiol, quando comparado aos grupos de ratas intactas e OVX tratadas com 300 µg de estradiol. A homeostase do fósforo está relacionada a alguns órgãos, como o intestino e os rins, sendo importante para a absorção de fósforo da dieta e a excreção na urina, respectivamente (Berndt, 1992; 2007). A vitamina D está relacionada à absorção intestinal de fósforo (Chen, 1974). Com isso, há a hipótese de que o fósforo não tenha sido absorvido adequadamente no intestino, pela deficiência de vitamina D, ou tenha sido excretado na urina. Porém, Berndt e colaboradores (2008), mostram que a concentração plasmática de fósforo pode ser alterada significativamente sem mudanças na absorção de fósforo no intestino ou mudanças na excreção pelos rins. Analisando os resultados biomecânicos obtidos em pesquisa realizada com os mesmos grupos de ratas utilizadas neste trabalho, e mesma faixa etária, onde houve melhor resposta à força mecânica o grupo de ratas OVX tratadas com 100 µg de

estradiol, hipotetizamos a utilização do fósforo na remineralização óssea trabecular, que se encontra em maior concentração na cabeça do fêmur, local onde foi incidida a força no teste biomecânico (Duarte, 2010). Talvez não verificamos maior concentração mineral de fósforo no grupo de ratas OVX com 100 µg de estradiol, pois a região óssea analisada foi o terço médio, região de osso cortical.

A fosfatase alcalina é o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado (Vieira, 1999). É produzida pelos osteoblastos e estão aumentadas nos estados de remodelamento ósseo acelerado (Rosen, 2005). Nos resultados obtidos neste trabalho, a concentração de fosfatase alcalina plasmática encontra-se significativamente menor nos grupos de ratas OVX tratadas com 200 e 300 µg de estradiol. Entretanto, para a interpretação dos valores de fosfatase alcalina óssea deve ser considerado o fato de que eles não aumentam exclusivamente com o aumento da formação óssea, mas também em alterações ósseas como na osteomalacia. Já na osteoporose, os valores de fosfatase alcalina estão usualmente dentro da normalidade. Como o método utilizado para análise da fosfatase alcalina não foi tecido-específico, devemos considerar a existência de produção extra-óssea, frequentemente hepática, pois mais de 90% do seu valor corresponde às isoformas hepática e óssea. A forma óssea, secretada pelos osteoblastos, predomina na infância até o fim do crescimento longitudinal, quando então a hepática passa a ser a forma circulante mais abundante. Hoje ainda é o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado (Vieira, 1999; Bikle, 1997). Assim, hipotetizamos que a diminuição significativa da fosfatase alcalina detectada nos animais OVX pré-tratados com 200 e 300 µg de E₂ pode ser resultado de alteração hepática. As alterações decorrentes da hipofosfatase sugerem fortemente que a enzima participe dos processos de mineralização.

Os cristais de hidroxiapatita do osso mineralizado contêm quantidades significativas de sódio, magnésio, carbonato, fluoreto e íons citrato, mas cálcio e fósforo são os principais constituintes. Fatores que regulam sua suplementação, absorção, deposição e retirada do tecido ósseo contribuem para a saúde, a estrutura e a resistência óssea. Entre estes fatores, o hipoestrogenismo é determinante especial sendo que após a menopausa ocorre aumento da perda de cálcio. Tem-se que a piora da absorção intestinal de cálcio exerce ação importante na patogênese da osteoporose. Para que o organismo tenha os seus requerimentos de cálcio atendidos, é necessário que se encontre suficiente quantidade de cálcio na luz intestinal e que a absorção se faça eficientemente. Os marcadores bioquímicos da remodelação têm, em tese, a vantagem de mostrar a realidade momentânea da remodelação óssea, contrariamente a densitometria óssea, que poderia apenas expressá-la retrospectivamente. Igualmente, esses exames, além de identificar as perdas rápidas de massa óssea, permitem predizer o prognóstico das pacientes que responderão melhor ao tratamento com as drogas anti-reabsortivas ou estimuladoras da formação óssea.

O fluoreto tem o potencial para aumentar a massa óssea por meio de ação mitogênica de osteoblastos de maneira dose-dependente (McDowell, 1992; Kleerekoper, 1996). Alguns estudos experimentais têm demonstrado que o flúor também reduz a reabsorção óssea, pois produz cristais de fluorhidroxiapatita maiores e menos solúveis que a hidroxiapatita tri-cálcico (Devogelaer *et al.*, 1995). Algumas experiências clínicas têm confirmado a capacidade de flúor em aumentar a espessura do osso trabecular do esqueleto axial e conteúdo mineral ósseo, enquanto outros estudos mostraram que o flúor tem influência modesta na remodelação óssea de osso cortical (Schraer, 1986; Cheng, 1988). Reabsorção e formação parecem estar em relativo equilíbrio, mas o aumento da remodelação

óssea leva ao aumento da porosidade do osso cortical (Mamelle et al., 1988). Além disso, as propriedades mecânicas do osso após o tratamento com fluoreto em estudos experimentais, apontaram resultados opostos, como aumento da força mecânica e fragilidade intrínseca do osso (Riggs et al., 1990). Baseado nestas informações e nos resultados obtidos, sugerimos que a menor concentração de fluoreto e de fosfatase alcalina detectada nos animais do grupo de ratas OVX que receberam pré-tratamento com 300 µg de estradiol resultam em processo de mineralização menor e conseqüentemente em menor resistência óssea.

O conjunto de resultados obtidos neste estudo indica que a concentração de 100 µg de estradiol atua controlando a taxa de formação e reabsorção óssea em organismo com hipoenestrogenismo. Quando comparados os grupos de ratas OVX pré-tratadas com 100 µg de estradiol e intactas, evidencia-se melhor metabolismo ósseo no grupo de ratas intactas. Tal análise mostra que, mesmo frente à concentração de estrógeno considerada adequada na terapia hormonal (reposição exógena), o funcionamento do próprio balanço hormonal que existe nas ratas intactas induzem à melhor resposta óssea.

Este estudo foi baseado nas evidências da participação do estrógeno no processo de remodelamento ósseo, em ratas ovariectomizadas e submetidas à terapia de reposição hormonal, com a finalidade de determinar a concentração do hormônio que atuaria no metabolismo ósseo sem desencadear tumores nos animais. A análise dos resultados obtidos por Duarte (2010) e Prates (2010) associados aos obtidos neste estudo, evidenciam que a utilização de 100 µg de estradiol, em relação a 200 e 300 µg estradiol, exerce atuação positiva sobre o metabolismo ósseo de ratas OVX, aos 6 meses.

CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos sugerem que a concentração de 100 µg de estradiol desencadeou eficácia maior nos índices dos marcadores do metabolismo ósseo de ratas OVX.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- BANDEIRA, F.; **“Osteoporose”**. 1ed. Rio de Janeiro: Medsi, 390p., 2000.
- BERNDT T., KNOX F.G.; **“Renal regulation of phosphate excretion”**. New York: Raven Press, 1992.
- BERNDT T., KUMAR R.; **“Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis”**. Annu Rev. Physiol. 69: 341-359, 2007.
- BERNDT T., KUMAR R.; **“Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis”**. Physiol. 24: 17-25, 2008.
- Bikle D.D.; **“Biochemical markers in the assessment of bone disease”**. Am. J. Med.; 103 :427-36, 1997.
- BLAIR, H. C.; **“How the osteoclast degrades bone?”** Bio Essays, v. 20, n. 10, p. 837-46, 1998.
- BOLSCHER, M. T.; NETELENBOS, J. C.; BARTO, R.; VAN BUUREN, L. M., VAN DER VIJGH, W. J. F.; **“Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact ovariectomized adult rat”**. J Bone Mineral. Res, 14, 1197-1202, 1999.
- CHEN T. C., CASTILLO L., KORYCKA-DAHL M., DELUCA H. F.; **“Role of vitamin D metabolites in phosphate transport of rat intestine”**. J. Nutr. 104: 1056-1060, 1974.
- CHENG P. T.; **“Fluoride reduces the rate of dissolution of bone”**. Bone Miner. 11: 51-59, 1988.
- COMPSTON, J. E.; **“Sex steroids and bone”**. Physiological Reviews, v.81, n.1, p. 419-47, 2001.
- CUMMINGS SR, NEVITT MC, BROWNER WS, et al.; **“Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Risk factors for hip fracture in white women”**. N Engl. J. Med; 332:767-73, 1995.
- DEVOGELAER J. P., NAGANT DE DEUXCHAISNES C.; **“Fluoride therapy of type I osteoporosis”**. Clin. Rheumatol. 14: 26-31, 1995.
- FROST, H. M.; **“A new direction for osteoporosis research: a review and proposal”**. Bone, v. 12, p. 429-37, 1991.
- HARMS, P.G.; OJEDA, S.R.; **“A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein”**. J appl physiol, 36: 391-92, 1974.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; **“Tecido ósseo”**. In: Histologia básica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, cap. 8, p. 111-28, 1999.

KLEEREKOPER, M.; **“Fluoride and the skeleton”**. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 33(2):139-61, 1996.

MAMELLE N., MEUNIER PJ, DUSAN R, GUILLAME M, MATRIN JL, GAUCHER A, PROST A, ZEIGLER G, NETTER P. ; **“Risk benefit ratio of sodium fluoride treatment in primary osteoporosis”**. Lancet 2:361–365, 1988.

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

MCDOWELL, L. R.; **“Fluorine: Minerals in animal and human nutrition”**. London: Academic Press; 1992.

MELTON, L. J.; KAN, S. H.; FRYE, M. A.; WAHNER, H. N.; O’FALLON, W. M.; RIGGS, B. L.; **“Epidemiology of vertebral fractures in women”**. Am. J. Epidem., v.120, p. 1000-1001, 1989.

OURSLEER, M.; **“Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts”**. Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression v.8, p.125-140, 1998.

PETTIFOR J.M.; ROSS F.P.; TRAVERS R.; GLORIEUX F.H.; DEL LUCA H.F.; **“Dietary Calcium Deficiency: A syndrome associated with bone deformities and elevated serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations”**. Metab. Bone Dis. Rel. Res. 2:301; 1981.

PIZAURO, J.M.; **“Discondria Tibial: Mecanismos de lesão e controle”**. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.4, n.3, p. 169-85, set. 2002.

RIGGS, B.L. MELTON, L.J.; **“Involutional osteoporosis”**. N. Engl. J. Med. 314:1676-86, 1986.

RIGGS B. L., HODGSON S, O’FALLON M, CHAO EYS, WAHNER HW, MUHS JM, CEDEL SL, MELTON LJ III.; **“Effect of fluoride treatment on the fracture rate in post-menopausal women with osteoporosis”**. N. Eng. J. Med., 12:802–809, 1990.

ROSEN, C. J.; **“Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis”**. N. Engl. J. Med. 353(6):595-603, Review, 2005.

SCHRAER H., POSNER A. S., SCHAER R., ZIPKIN I.; **“Effect of fluoride on bone minerals”**. Clin. Orthop., 86: 260-286, 1986.

SZEJNFELD, V. L.; **“Osteoporose: diagnóstico e tratamento”**. São Paulo: Sarvier, 406p, 2000.

VIEIRA, J. G. H.; **“Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática”**. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. vol.43, no.6, São Paulo, Dez. 1999.