

**unesp**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**

**Campus de São José dos Campos**

**Faculdade de Odontologia**

**ERIKA CRISTINA SBRISSE PEREIRA**

**ESTUDO DO LONGITUDINAL DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA  
NO FÊMUR DE RATAS**



**2011**

**ERIKA CRISTINA SBRISSE PEREIRA**

**ESTUDO LONGITUDINAL DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA NO  
FÊMUR DE RATAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Adj. Rosilene Fernandes da Rocha  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos  
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

P414e Pereira, Erika Cristina Sbrisse.  
Estudo longitudinal dos efeitos da deficiência estrogênica sobre o fêmur de  
ratas / Erika Cristina Sbrisse Pereira. \_\_ São José dos Campos : [s.n.], 2011  
70f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia  
de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.  
Orientador: Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha

1. Tecido ósseo. 2. Ovariectomia. 3. Deficiência estrogênica. 4. Osteopenia.  
5. Osteoporose. I. Rocha, Rosilene Fernandes da. II. Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD12

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por  
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 10 de junho de 2011.

Assinatura :

E-mail: erikasbrisse@yahoo.com.br

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha** (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

**Profa . Dra. Juliana Madureira de Souza Lima Alonso**

Faculdade de Odontologia

Faculdade de Pindamonhangaba- FAPI

**Profa. Adj. Mari Eli Leonelli de Moraes**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

**São José dos Campos, 30 de Junho de 2011.**

## **DEDICATÓRIA**

A minha família que sempre me apoiou e ajudou a conquistar mais este objetivo, estando sempre ao meu lado incentivando e entendendo cada momento de ausência.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha querida orientadora Rosilene Fernandes da Rocha, que sempre foi muito mais do que uma orientadora, foi uma amiga, uma mãe dedicada. Agradeço não só pela orientação na execução deste trabalho, mas também na orientação da vida, com seus conselhos e suas palavras de apoio, foi grande responsável por minha formação e crescimento. Recebeu-me de braços abertos desde a iniciação científica, uma pessoa a qual serei grata por toda vida e que levarei sempre em meu coração como exemplo de profissional e de pessoa. Uma pessoa verdadeiramente iluminada por Deus.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A meus amados pais Márcio e Hesli, que me deram a vida e apoiaram em cada decisão, tendo como prioridade minha felicidade e realização pessoal e profissional. Com muito amor e carinho souberam me ouvir e compreender cada momento que vivi nesses últimos anos. Obrigado meus amores.

A meus avós Vicente e Maura, que tiveram papel fundamental em minha vida cuidando de mim, se preocupando, se alegrando e se orgulhando com cada passo dado. Amo muito vocês.

A meu irmão Rafael que é minha vida, a pessoa com o melhor coração do mundo. Quem me alegra nos momentos de tristeza e ampara nos momentos de desespero. Sempre estive ao meu lado acredito ser uma pessoa abençoada por Deus que todos deveriam ter a oportunidade de conhecer. Te amo demais meu querido irmão.

Ao meu afilhado João Pedro que entendeu minhas ausências e mesmo não entendendo o que acontecia sempre estive comigo.

Aos meus tios e meu padrasto que sempre me trataram como filha, e estiveram todos os dias ao meu lado, em todas as horas.

Aos meus primos, que perto ou longe sempre estiveram presentes me alegrando.

Aos meus amigos Carol, Jucely e Daniel, que sempre foram amigos para todas as horas, pessoas maravilhosas que só me ajudaram.



## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo seu diretor Prof. Adj. José Roberto Rodrigues, por possibilitar a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora Prof<sup>a</sup> Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal.

Aos colegas do programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pela convivência e troca de experiências.

Aos funcionários do biotério Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antônio Corrêa Alfredo, pela colaboração e atenção durante os procedimentos de experimentação animal.

As secretárias do programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka pela atenção e disponibilidade.

A todos os funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada pela convivência.

*A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Remodelação óssea.....	16
2.2 Deficiência hormonal e remodelação óssea.....	18
2.3 Osteoporose.....	20
2.4 Alterações biomecânicas na osteoporose.....	22
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>26</b>
4.1 Animais e grupos experimentais.....	26
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	27
4.2.1 Anestesia.....	27
4.2.2 Ovariectomia e laparotomia (cirurgia <i>Sham</i> ).....	28
4.3 Eutanásia.....	29
4.4 Análise dos resultados.....	30
4.4.1 Peso corporal dos animais.....	30
4.4.2 Análise do fêmur.....	30
4.4.2.1 Análise da densidade óptica radiográfica da região de colo do fêmur	30
4.4.2.2 Análise das propriedades biomecânicas.....	32
4.5 Análise estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
5.1 Peso corporal dos animais.....	37
5.2 Densidade óptica radiográfica.....	39
5.3 Propriedades biomecânicas.....	42
5.3.1 Força máxima.....	42
5.3.2 Rigidez.....	44
5.3.3 Módulo de elasticidade (E).....	47

5.3.4 Resistência máxima (S).....	49
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>69</b>

Pereira ECS. Estudo longitudinal dos efeitos da deficiência estrogênica no fêmur de ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ. Estadual Paulista; 2011.

## RESUMO

É cada vez maior a parcela de pessoas idosas na população brasileira e com este fenômeno o número de pessoas afetadas por patologias crônico-degenerativas. Dentre estas uma doença que merece destaque é a osteoporose, uma vez que vem se tornando um problema de saúde pública. Um dos principais fatores de risco para osteoporose é a deficiência estrogênica, sendo assim este estudo objetivou avaliar o efeito da deficiência estrogênica no tecido ósseo durante um período de 360 dias através de análise radiográfica e biomecânica. Para tanto 80 ratas, com 3 meses de idade e peso de aproximadamente 250g, foram divididas em 10 grupos experimentais (n=8) de acordo com o tempo de sacrifício e cirurgia a que foram submetidas (ovariectomia e cirurgia sham). As ratas pertencentes aos grupos OVZ e SHAM tiveram sua ração controlada (30g por animal). Após o período determinado (30, 60, 90, 180 e 360 dias das cirurgias) as ratas foram pesadas, anestesiadas e sacrificadas e seus fêmures retirados para análise. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. De acordo com os resultados obtidos observou-se que nos períodos de 30, 60 e 90 dias os efeitos da deficiência estrogênica sobre o tecido ósseo foram significativos.

Palavras chaves: Tecido ósseo. Ovariectomia. Deficiência estrogênica. Osteopenia. Osteoporose

Pereira ECS. Longitudinal study of estrogen deficiency on fêmur rats.[dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2011.

## **ABSTRACT**

*The Brazilian population has undergone a process of aging, and this phenomenon with the number of people affected by chronic diseases is increasing. Among these a disease that deserves mention is osteoporosis, since it has become a public health problem. One of the main risk factors for osteoporosis is estrogen deficiency, so to better understand how estrogen deficiency affects the bone tissue present study aimed to evaluate the effect of estrogen deficiency on bone tissue over a period of 360 days by radiographic and biomechanics analysis. For this purpose 80 rats, 3 months old and weighing about 250g were divided into 10 groups (n = 8) according to the time of sacrifice and who underwent surgery (ovariectomy and sham surgery). The rats belonging to groups OVZ and SHAM had controlled his diet (30g per animal). After the specified period (30, 60, 90, 180 and 360 days of surgery) the rats were weighed, anesthetized and sacrificed, and their femurs were removed for analysis. Data were submitted to ANOVA and Tukey tests with significance level of 5%. According to the results obtained showed that in periods of 30, 60 and 90 days the effects of estrogen deficiency on bone tissue were significant.*

**Keywords:** Bone Tissue. Ovariectomy. Estrogen deficiency. Osteopeny. Osteoporosis

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços da medicina e transformações no estilo de vida da população vêm repercutindo no aumento da expectativa de vida da população (Frazão, Naveira, 2006), fato este que vem ocorrendo a mais tempo na Ásia e Europa e mais recentemente nas Américas (Carvalho, Garcia, 2003; Carvalho, Rodriguez-Wong, 2008).

No Brasil, entre 1980 a 2000, a população idosa teve um crescimento de 107%, representando 8,6% da população brasileira (IBGE, 2000; Beltrão et al., 2004 ). Estimativas revelam que no ano de 2050 a população idosa deverá ultrapassar 50 milhões (Martini et al., 2009).

Este aumento na expectativa de vida tem como consequência o aumento do número de afetados por doenças crônico-degenerativas, sendo a osteoporose, atualmente, a doença osteometabólica mais prevalente no mundo, constituindo-se como um importante problema de saúde pública, com grande impacto econômico e social, atingindo cerca de 325 milhões de pessoas, com mais de 65 anos (Aleksa et al., 2003; Frazão, Naveira, 2006; Jagelavicene, Kubilius, 2006; Yazbek, Neto 2008; Cole et al., 2009; Riera-Espinoza, 2009).

O número de pessoas com osteoporose vem crescendo, sendo a população do sul da Europa ligeiramente menos atingida que a dos Estados Unidos. Na América Latina, esse número também vem aumentando, atingindo no Brasil cerca de 10 milhões de pessoas, representando este dado, aproximadamente de 1 em cada 17 idosos (Riera-Espinoza, 2009).

Os fatores de risco para o desenvolvimento dessa enfermidade incluem alcoolismo, fumo, consumo exagerado de cafeína,



má nutrição, deficiência de cálcio e de vitaminas do grupo B, C, D e K, uso prolongado de glicocorticóides, imunossupressores, anticonvulsivantes, raça, menopausa precoce, histerectomia, ooforectomia, hipogonadismo, sexo feminino e idade avançada (Jagelaviciene, Kubilius, 2006; Frazão, Naveira, 2007; Baum, Peters, 2008; Pinheiro et al., 2010).

Em indivíduos do sexo feminino tem sido observada que a deficiência hormonal resulta num maior processo de reabsorção óssea, uma vez que os estrógenos e andrógenos são necessários no processo de formação, maturação e remodelação óssea (Armada et al., 2006).

O estrógeno apresenta um papel fundamental no metabolismo ósseo, tanto em homens quanto em mulheres. As mulheres apresentam níveis elevados de estrógeno atuando em seu organismo, níveis estes que caem bruscamente durante o período pós-menopáusicos; já os homens apresentam menores níveis de estrógeno em seu organismo e este decresce de forma gradual durante o envelhecimento (Khosla et al., 2005). Devido a essas diferenças, tem sido observado que as alterações causadas pela deficiência dos hormônios sexuais atingem de forma mais agressiva os ossos das mulheres e também as acometem mais cedo, quando comparadas aos homens (Armada et al., 2006).

Assim, este estudo se justifica por apresentar os efeitos da deficiência estrogênica a curto, médio e longo prazo no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas. A hipótese deste trabalho foi que a deficiência estrogênica apresentava maiores efeitos no tecido ósseo a curto prazo no período pós-ovariectomia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Remodelação óssea

O tecido ósseo possui algumas funções básicas como proteção, suporte e locomoção; influenciado por fatores sistêmicos e locais. Dentre os fatores sistêmicos podem-se citar a regulação hormonal, fatores de crescimento e como fatores locais pode-se citar as tensões a quais este tecido é submetido para as execuções das atividades diárias (Junqueira, Carneiro, 2010). Histologicamente, o tecido ósseo é constituído por: células osteogênicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, contidos em abundante matriz intercelular (Bandeira et al., 2000; Tortora, Grabowski, 2002; Andia et al., 2006).

Juntamente com os músculos, os ossos são responsáveis pela sustentação de órgãos vitais, estando sujeitos constantemente a tensões de tração, compressão, flexão, torção e geralmente combinações de todas essas forças, conseqüentemente existe o surgimento de fraturas quando a integridade do osso não é preservada (Malosso, 2004).

O osso é um tecido dinâmico que passa por um processo contínuo de formação e reabsorção. As células deste tecido estão sob ação de múltiplos fatores locais e sistêmicos que controlam o processo de remodelação, tais como fatores físicos e hormonais (Andia et al., 2006).

O tecido ósseo é metabolicamente ativo e vivo, sendo caracterizado pela intensa atividade de remodelação. Atividade esta que é caracterizada por uma formação óssea maior do que reabsorção no período de crescimento, resultando num aumento da massa óssea; atingindo um pico de massa no período de adolescência, e um período de estabilização onde formação e reabsorção acontecem igualmente na

idade adulta. No envelhecimento a reabsorção óssea aumenta excedendo a formação e o processo de remodelação apresenta um balanço negativo, resultando numa diminuição da massa óssea (Guyton, Hall, 2002).

O ciclo completo de remodelação consiste em três fases: reabsorção, reversão e formação levando de 2-3 meses dependendo do local em que acontece. Este fenômeno tem por principais objetivos a renovação do tecido ósseo, distribuição da matriz ao longo das linhas de tensão mecânica, reparação do osso e hemostasia iônica (Rang et al., 2004; Ynsa et al., 2006).

A reabsorção ocorre quando osteoclastos acidificam o meio e liberam diversas enzimas que degradam a matriz mineral óssea, criando uma cavidade denominada “lacuna de Howship”. Este processo é seguido por um período de reversão, onde osteócitos, monócitos e pré-osteoblastos preparam a matriz óssea para que os osteoblastos iniciem a formação de osso. A formação se dá quando osteoblastos alcalinizam o meio e depositam cristais de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita, mineralizando a matriz osteóide (Vasikaran, 2008; Goldenberg, 2009; Montecinos, Zeni, 2009). Estima-se que aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical são renovados anualmente (Manolagas, Jilka, 1995).

Entre os fatores que regulam a homeostasia do tecido ósseo destacam-se os hormônios moduladores do metabolismo de cálcio (hormônio paratireóideano, calcitonina e vitamina D) e os que influenciam no processo de remodelação indiretamente (hormônios sexuais e do crescimento) (Turner, Sibonga, 2001).

Um desequilíbrio no processo de remodelação pode causar perda de massa óssea (osteopenia), juntamente com a deterioração microarquitetural do esqueleto, levando a um aumento na fragilidade óssea e no risco de fraturas (Ynsa et al., 2006).

## 2.2 Deficiência hormonal e remodelação óssea

Existe uma relação bem definida entre a deficiência dos hormônios sexuais e o osso, uma vez que os estrógenos e andrógenos são necessários no processo de formação, maturação e remodelação óssea; existindo receptores desses hormônios nos osteoblastos, sendo estes essenciais no desenvolvimento do esqueleto (Faloni, Cerri, 2007; Folwarczna et al., 2007).

Os hormônios sexuais têm um importante papel no desenvolvimento de ossos e músculos, apresentando-se até maiores do que os fatores genéticos e ambientais. Sendo, o estrógeno atuante no metabolismo ósseo tanto em homens quanto em mulheres (Khosla et al., 2005; Fugita et al., 2006).

A testosterona é metabolizada pela ação da 5-alfa-redutase para o androgênio biologicamente ativo, diidrotestosterona, e pela ação da aromatase em estradiol. Sendo a produção desta regulada pelo mecanismo de *feedback* negativo, que envolve o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio liberador de LH (LHRH), compondo o eixo hipotálamo-hipófisário-gonadal. Esse hormônio é há muito tempo conhecido pelos seus efeitos anabolizantes (Caioroli, 2004). A testosterona regula diretamente a proliferação, diferenciação e capacidade de mineralização dos osteoblastos (Prevelic, 2001; Riggs et al., 2002) e causa retenção de cálcio, com a capacidade de aumentar o tamanho e a força dos ossos e por isso é freqüentemente utilizada em idosos para tratar a osteoporose (Guyton, Hall, 2002).

Na mulher, os androgênios decrescem lenta e progressivamente a partir da quarta década e por toda a vida. O declínio androgênico precede o estrogênico, resultado do decréscimo linear na produção de dehidroepiandrosterona e testosterona pelas adrenais. O declínio desses podem gerar um estado de deficiência que se manifesta

insidiosamente por diminuição da função sexual, bem estar e energia, alterações na composição corporal e perda de massa óssea (Leão et al., 2005).

Os estrógenos são hormônios que compõe o sistema reprodutor masculino e feminino, produzindo numerosas ações fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para fertilização e implantação do óvulo e ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas, lipídios e sistema cardiovascular (Ruggiero, Likis, 2002; Kuiper et al., 2003; Amadei et al., 2006).

Receptores de estrógenos podem ser encontrados em vários tecidos, predominando o subtipo  $\alpha$  (alpha) em mama e útero e o subtipo  $\beta$  predomina no osso e tecido cardiovascular (Diez-Perez, 2006).

Um dos principais mecanismos pelo qual esse hormônio atua no osso é através da inibição da diferenciação dos osteoclastos tanto direta quanto indiretamente. O estrógeno regula a diferenciação e formação dos osteoblastos modulando a produção de citocinas osteoclastogênicas (Faloni, Cerri, 2007). Um aumento dos níveis circulantes de interleucina 1 (IL 1) e interleucina 6 (IL6) são observadas no período pós-menopáusicos e são o primeiro indicativo do início da perda óssea resultante da deficiência estrogênica (Manolagas, 1995.).

Para melhor compreender a atuação do estrógeno, nos mecanismos envolvidos na regulação da reabsorção, Srivastava et al. (2001) realizaram um trabalho, utilizando cultura de monócitos da medula óssea, constatando que, além de atuar modulando a produção de citocinas, o estrógeno também afeta a sensibilidade das células precursoras dos osteoclastos ao RANKL, uma das citocinas envolvidas na sua diferenciação.

Outro importante mecanismo que justifica o aumento da reabsorção óssea com a deficiência do estrógeno foi relatado por Hughes

et al., 1996 que demonstraram que o  $17\beta$  estradiol promove apoptose de osteoclastos maduros bem como de seus precursores.

Assim, o estrógeno inibe a reabsorção óssea por induzir a apoptose, tanto direta quanto indiretamente (Fountas et al., 2004).

O estrógeno ainda pode atuar afetando a regulação hormonal dos níveis de cálcio, como a calcitonina e o paratormônio (Balash, 2003).

Em seu estudo, Armada, et al., 2006, utilizou mandíbula de ratos *Wistar* machos e fêmeas, com deficiência hormonal induzida por castração aos três meses com diferentes períodos de sacrifício (30, 60 e 90 dias) e observou através de análise morfométrica que tanto a deficiência hormonal quanto o envelhecimento resultam em danos ao tecido ósseo, implicando em um maior processo de reabsorção óssea. As alterações causadas pela deficiência dos hormônios sexuais tem se mostrado mais marcantes nos ossos das ratas fêmeas do que quando comparadas aos machos, e essas alterações também acontecem mais precocemente nesse sexo.

### **2.3 Osteoporose**

Atualmente a osteoporose é a doença osteometabólica mais prevalente no mundo, constituindo um problema de saúde pública, atingindo a sociedade de forma social e econômica (Ramalho et al., 2001; Alekna et al., 2003).

A osteoporose é caracterizada por uma redução crônica e progressiva da densidade mineral e da matriz óssea, tendo como resultado a perda óssea e mudanças em sua microarquitetura, tornando o osso frágil e propício a fraturar-se facilmente. Geralmente essa perda

óssea é mais marcante no osso trabecular do que no osso cortical (Kazanavicius et al., 2003; Patel, Murphy, 2006 ).

O diagnóstico de osteoporose atualmente adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é avaliado por meio da absorciometria de dupla emissão de raios X (DEXA). Com este método determina-se o valor da densidade mineral óssea (DMO) na coluna lombar e no colo do fêmur, que são representativos do osso trabecular e cortical respectivamente. O valor da DMO do indivíduo é comparado com o valor médio da DMO de um conjunto de indivíduos jovens do mesmo sexo, com valores no pico de massa óssea. Dessa relação, obtém-se o *T score*, ou seja, o número de desvios-padrão abaixo dos valores do grupo controle jovem. Considera-se que a mulher sofre de osteopenia se o valor do *T* está compreendido entre -1 e -2,5 e de osteoporose se é inferior a -2,5, sendo a massa óssea considerada normal para valores de *T-score* superiores a -1 (National Institute of Health, 2000; French et al., 2002; Gilbert, Mckiernan, 2005).

A osteoporose ainda pode ser classificada como primária ou secundária. A primária está relacionada ao envelhecimento, ao período após a menopausa ou a causa idiopática. A secundária caracteriza-se por manifestação de um processo patológico claramente identificado, dentre eles as alterações endócrinas como hipogonadismo, aumento da atividade do paratormônio, hipertireodismo, desordens adrenais, mieloma múltiplo, artrite reumatóide, alcoolismo e uso crônico de corticóides (Bandeira et al., 2000; Guarniero, Oliveira, 2004; Vondracek, Hansen, 2004).

A osteoporose primária geralmente é observada em mulheres no período pós-menopáusico, o qual está intimamente relacionado à deficiência estrogênica, resultando numa rápida perda óssea (Modesto Filho et al., 1996, Brandão, Hauache, 2005). Já em homens esse tipo de osteoporose tende a ocorrer em maiores de setenta

anos e pode estar também associada à deficiência na absorção de cálcio e redução da vitamina D (Vondracek, Hansen, 2004).

A incidência da osteoporose secundária é maior na população masculina, correspondendo a 64% dos casos de osteopenia em homens, enquanto atinge apenas 30 % das mulheres, sendo a causa mais frequente, em ambos os sexos, o uso crônico de glicocorticóides (Brandão, Hauache, 2005).

Dentre os principais fatores de risco para osteoporose estão o fumo; alcoolismo; consumo exagerado de cafeína; má nutrição; deficiência de cálcio e de vitaminas do grupo B; C, D e K; uso prolongado de glicocorticóides, imunossupressores, anticonvulsivantes, raça, menopausa precoce, histerectomia, ooforectomia, hipogonadismo, sexo feminino e idade avançada (Hildebolt, 1997; Brown, Josse, 2002; Jagelaviciene, Kubiilus, 2006).

Atualmente diversos fármacos tem sido utilizados para o tratamento da osteoporose, podendo ser divididos em dois grupos principais: agentes anti-reabsorção do tecido ósseo (estrogênios, calcitonina e bifosfonatos) e agentes estimuladores da formação óssea (fluoreto de sódio e paratormônio)(Russo, 2001; Guarniero, Oliveira, 2004).

#### **2.4 Alterações biomecânicas na osteoporose**

O osso é considerado um material viscoelástico uma vez que apresenta propriedades mecânicas que diferem de acordo com a taxa de carregamento, ou seja, a capacidade de escoar internamente conforme a carga aplicada (Einhorn, 1996).

A determinação das propriedades mecânicas de um material pode ser realizada por meio de vários tipos de ensaios



destrutivos ou não destrutivos. Entre os destrutivos temos tração, impacto, flexão, torção, compressão, fadiga, sendo o teste de flexão muito aplicado em materiais frágeis ou de elevada dureza para medir sua resistência e ductilidade (Souza, 1977; Souza, 1982).

A resistência mecânica do tecido ósseo é dada por sua conformação geométrica, sendo esta dependente da disposição da arquitetura do trabeculado ósseo (Dempster et al., 1995).

O processo de regulação das propriedades biomecânicas é executado diretamente por um “mecanostato” (cujo estímulo é regulado pelo uso mecânico regional do osso) e pelo equilíbrio endócrino metabólico. Sendo assim, a osteoporose pode ser considerada como uma doença de adaptação mecanostática decorrente de uma estrutura insuficiente ou de uma regulação inadequada do mecanismo correspondente (Ferretti et al., 1995).

Ferretti et al. (1997) defendem que, na instalação da osteoporose, a massa óssea não é mais importante do que as propriedades biomecânicas do osso para explicar a fragilidade e o risco à fratura, uma vez que esta decorre da deformação irreversível de uma região óssea que gera sofrimento mecânico (*stress*) suficiente para vencer a resistência do material. Essa resistência óssea depende das propriedades mecânicas de cada osso (microarquitetura, grau de calcificação e porosidade) e também da distribuição espacial de seu material cortical e trabecular, resultante do processo de remodelação.

Hogan et al. (1997) utilizando técnicas histomorfométricas e o teste de flexão de três pontos comprovaram em ratas de várias faixas etárias e osteopênicas pelo uso crônico de álcool, que o tamanho e as propriedades extrínsecas de seus fêmures eram menores que nas ratas normais. Ao mesmo tempo, depois da fratura, determinaram o módulo de elasticidade de cada fêmur, utilizando o cálculo do “*cross sectional moment of inertia*” (CSMI) por meio do estudo de imagens digitalizadas de cortes usados para histomorfometria.

Hoyer e Lippert (1982) realizaram um estudo longitudinal comparando peso, comprimento e propriedades mecânicas dos ossos (fêmur, tíbia e úmero) de ratos machos e fêmeas normais com o aumento da idade. Os autores concluíram que geralmente os valores apresentados pelos machos ao decorrer da idade sempre eram maiores que os das fêmeas. Contudo, eles afirmam que esta diferença está muito mais relacionada à variação de peso corporal (que nos machos é maior) do que a idade propriamente dita.

Comelekoglu et al. (2007) realizaram um estudo avaliando as propriedades biomecânicas do fêmur de ratas com osteoporose, utilizando ratas ovariectomizadas para o modelo de osteoporose. Ao fim do experimento, os autores concluíram que na osteoporose os parâmetros biomecânicos do fêmur eram diminuídos, quando comparados aos ratos controle.

Nesse sentido, a instalação do processo de osteoporose está associado a mudanças significativas na morfologia e composição óssea com consequentes alterações nas propriedades biomecânicas. Estas diferenças ainda são objeto de muitos estudos e já foram atribuídas às mudanças na concentração das fibras de colágeno dos ossos de indivíduos de diferentes faixas etárias (Zioupos et al., 1999).

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo desse trabalho foi acompanhar no período de um ano o efeito da deficiência estrogênica induzida por castração, sobre o tecido ósseo, em fêmur de ratas através de análise da densidade óptica radiográfica e biomecânica.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Animais e grupos experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética sob nº011/2010-PA/CEP( Anexo A).

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 80 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), com três meses de idade, massa corpórea de aproximadamente 250 gramas, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente, alimentadas com ração Guabi Nutrilabor (aproximadamente 30g por animal) e água *ad libitum*, os quais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

Os oitenta animais constituintes da amostra foram inicialmente divididos em dois grupos experimentais , sendo estes: OVZ (n=40) grupo ovariectomizado, e SHAM (n=40) grupo de animais submetidos a laparotomia e exposição dos ovários, sem a retirada dos mesmos.

Para as condições experimentais acima citadas, foi realizada a subdivisão dos animais em cinco subgrupos de acordo com o tempo de eutanásia (quadro 1).

Quadro 1- Divisão dos grupos experimentais conforme o tempo de eutanásia

<b>Grupos n=8</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Tempo de Eutanásia (dias)</b>
G1	OVZ	30
G2	OVZ	60
G3	OVZ	90
G4	OVZ	180
G5	OVZ	360
G6	SHAM	30
G7	SHAM	60
G8	SHAM	90
G9	SHAM	180
G10	SHAM	360

## 4.2 Procedimentos cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em sala cirúrgica cuidadosamente limpa, do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

### 4.2.1 Anestesia

Para todos os procedimentos experimentais, como realização da ovariectomia e laparotomia, os animais foram anestesiados com uma dose de 13mg/kg de cloridrato xilazina 2% (Anasedan - Bayer

do Brasil - São Paulo, SP, Brasil), substância com propriedades sedativas, analgésicas e relaxante muscular, com 33mg/kg de cetamina base (Dopalen-Agribrands do Brasil - Jacareí, SP, Brasil), anestésico geral, por via intramuscular.

#### 4.2.2 Ovariectomia e laparotomia (cirurgia *Sham*)

As ratas pertencentes ao grupo ovariectomizado, aos 3 meses de idade, após anestesia, depilação da região abdominal lateral e anti-sepsia com álcool iodado, sofreram incisão longitudinal com extensão aproximada de 1cm na pele e musculatura da região lateral do corpo, na linha média, próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. Após os ovários serem identificados e expostos foi realizada amarra com fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson), e remoção dos ovários juntamente com a gordura circundante e pequena porção do útero. Ao final dos procedimentos, as camadas musculares e a pele foram suturadas com fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson - São José dos Campos) (Figura 1).

Nos animais do grupo *Sham* todos os procedimentos acima foram realizados, para simulação do estresse cirúrgico, exceto a hemostasia e remoção dos ovários. Portanto, após a exposição dos ovários, os mesmos foram recolocados na cavidade abdominal e os tecidos suturados.

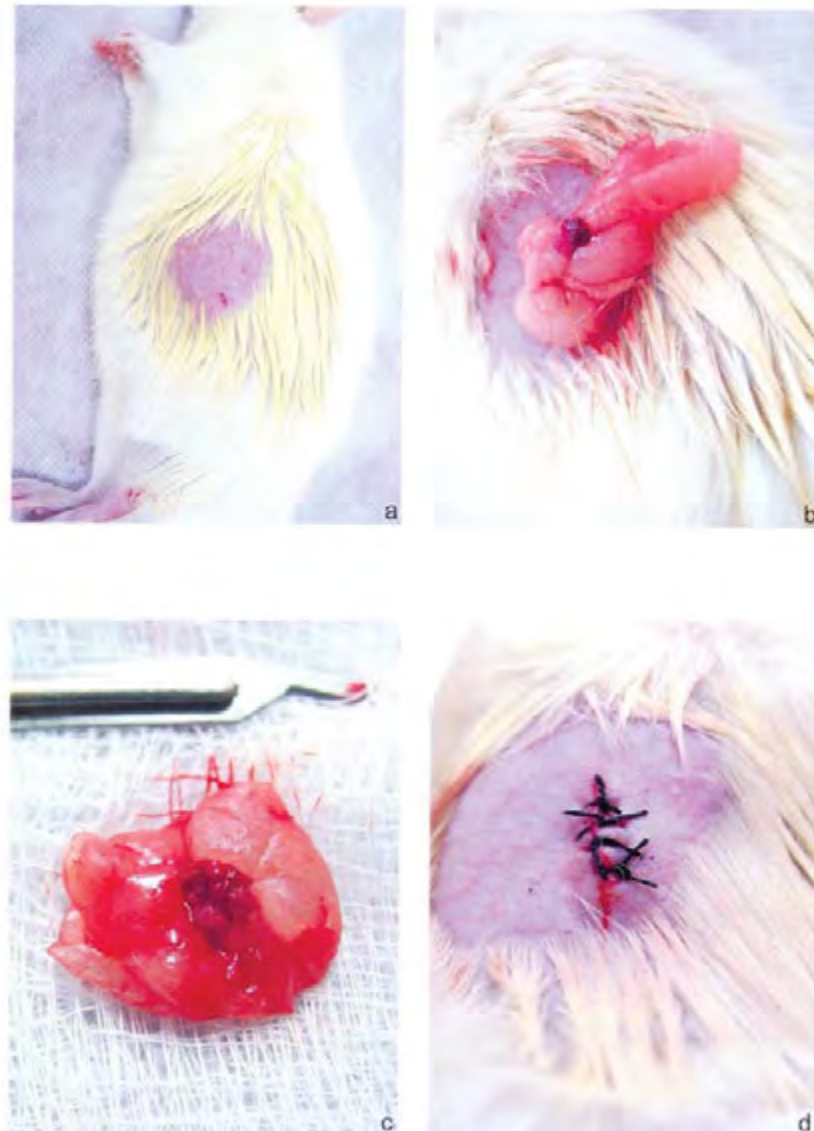


Figura 1 - Ovariectomia; a)local do procedimento cirúrgico; b)exposição do ovário e cirurgia circundante; c)ovário removido; d)sutura.

### 4.3 Eutanásia

Obedecendo ao tempo determinado para a eutanásia, os animais receberam uma dose excessiva de anestésico e foram decapitados em guilhotina, sendo seus fêmures removidos e fixados em

formol a 10% ou solução de Ringer, de acordo com as análises as quais seriam submetidos.

#### **4.4 Análise dos resultados**

##### **4.4.1 Peso corporal dos animais**

O peso corporal de cada animal foi verificado no dia da cirurgia de ovariectomia e laparotomia e na data da eutanásia para verificação de variação no peso corporal dos animais. Para tanto, cada animal foi colocado em gaiola individual e pesado (g) em balança digital (Micronal B600- São Paulo, SP, Brasil). O percentual de aumento de peso dos animais foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{Variação de peso (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial} \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

##### **4.4.2 Análise do fêmur**

###### **4.4.2.1 Análise da densidade óptica radiográfica da região de colo do fêmur**

O aparelho radiográfico utilizado para a obtenção das imagens foi o Gendex 765DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chigado, IL, USA*) trabalhando em regime de 65KV e 7mA com filtração de 2mmAl, ponto focal de 0,4mm e área focal de 6cm,



distância foco-sensor de 30 cm, e 0,02 s de tempo de exposição, com o feixe central de raios X incidindo perpendicularmente ao sensor.

Para proceder as incidências radiográficas os fêmures esquerdos de cada animal, após limpeza e fixação em formol foram posicionados de forma que sua face distal ficasse voltada para baixo, ficando a região de cabeça e colo de fêmur bem apoiadas sobre o sensor do sistema digital, mantendo assim, um mesmo padrão de posicionamento para a aquisição da imagem radiográfica digital.

Foi utilizado o sistema de radiografia digital direta intrabucal Visualix Gx-S HDI (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chigado, IL, USA*). Programa de computador VixWin 2000 (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chigado, IL, USA*) que acompanha o sistema Visualix.

Todas as imagens foram arquivadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*) para não haver perda de qualidade nas mesmas.

O programa de edição de imagens *Adobe Photoshop 7.0* (*Adobe systems incorporated, 345 Park Avenue, San Jose, California 95110, USA*), foi utilizado para análise da densidade óptica das imagens radiográfica.

A partir das imagens arquivadas referentes aos fêmures dos animais, foi selecionada uma área de tamanho 50 x 50 pixels na região de colo do fêmur, compreendendo apenas a região medular da peça em questão, sem abranger as áreas corticais laterais, a qual foi aplicada a ferramenta histograma, que forneceu a média da densidade óptica em pixels da região. Os valores de cinza da imagem foram baseados em uma escala de 256 possíveis tonalidades de cinza, variando do preto absoluto com valor zero, ao branco absoluto valendo 255 (figura 2).

A avaliação pela mensuração de cada região foi repetida por três vezes, com intervalos de uma semana para cada uma delas, pela

mesma examinadora, previamente treinada, autora principal deste trabalho.

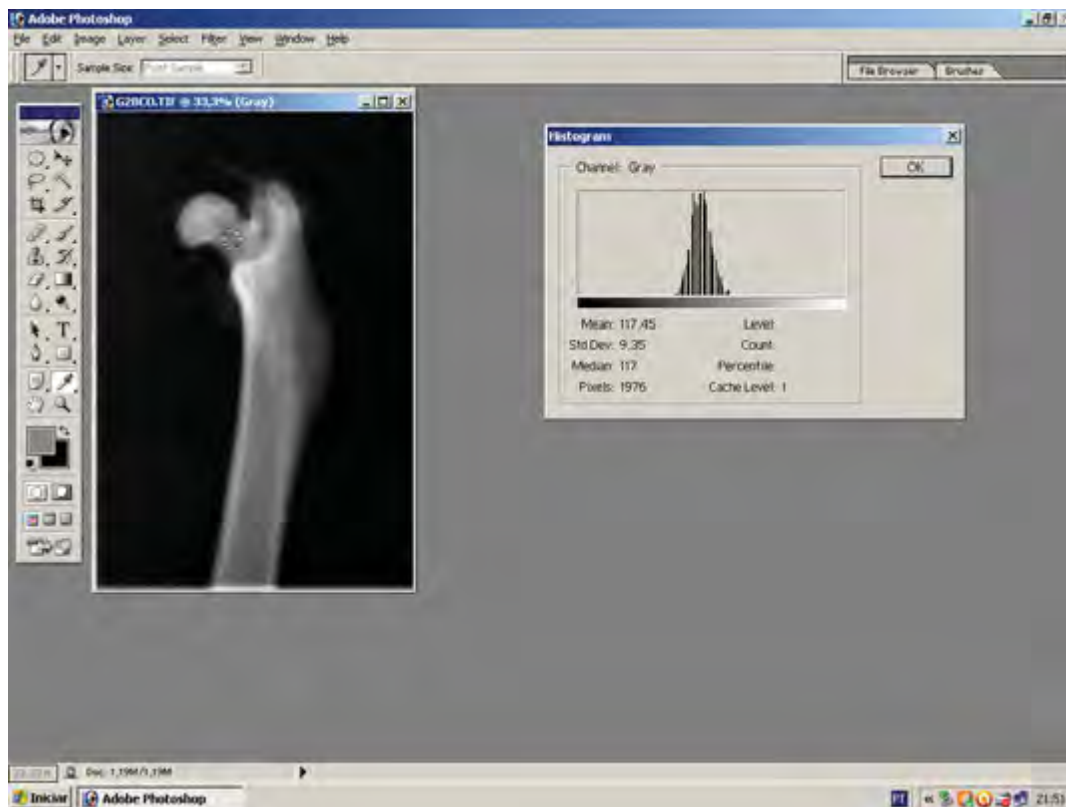


Figura 2 – Fêmur analisado pelo programa de edição de imagens Adobe Photoshop 7.0.

#### 4.4.2.2 Análise das propriedades biomecânicas

O fêmur direito, após remoção e dissecação, foi mantido em solução de Ringer, refrigerado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises.

Para manutenção dos espécimes em equilíbrio térmico com o meio ambiente, 24 h antes da realização dos ensaios, os fêmures foram retirados do freezer para que pudessem descongelar de forma gradativa, evitando assim microfraturas.

Com auxílio de um paquímetro digital (Starret 727, Itu, São Paulo) foi realizada a mensuração do comprimento e espessura

médio-lateral e largura antero-posterior da região mediana da diáfise do fêmur.

A partir de então foram avaliadas as propriedades mecânicas do tecido ósseo, propriedades estas que podem ser divididas em intrínsecas, que se referem ao comportamento do material somente a nível tecidual, e extrínsecas que se referem ao osso como um todo, refletindo em seus valores os efeitos combinados do tamanho, da forma e das características teciduais.

As propriedades extrínsecas dos fêmures foram determinadas por meio do teste de resistência à flexão por três pontos.

Cada espécime foi colocado centralizado, ao longo de seu comprimento, sobre um suporte contendo dois apoios (distantes 15 mm um do outro), com sua face anterior voltada para baixo. A carga foi aplicada transversalmente ao longo eixo do fêmur sobre sua face posterior em um ponto médio entre os dois apoios. O suporte de aplicação da carga e os apoios utilizados apresentavam forma cilíndrica com um diâmetro de 3 mm.

O ensaio foi conduzido em uma máquina universal de ensaios (Emic<sup>®</sup> - modelo DL 200 MF. Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais - Brasil), que proporcionou uma força de 50 kgf com uma velocidade constante de aplicação de 5.08mm/minuto até a falha do espécime (figura 3). Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente, sendo os espécimes mantidos úmidos em solução de Ringer.

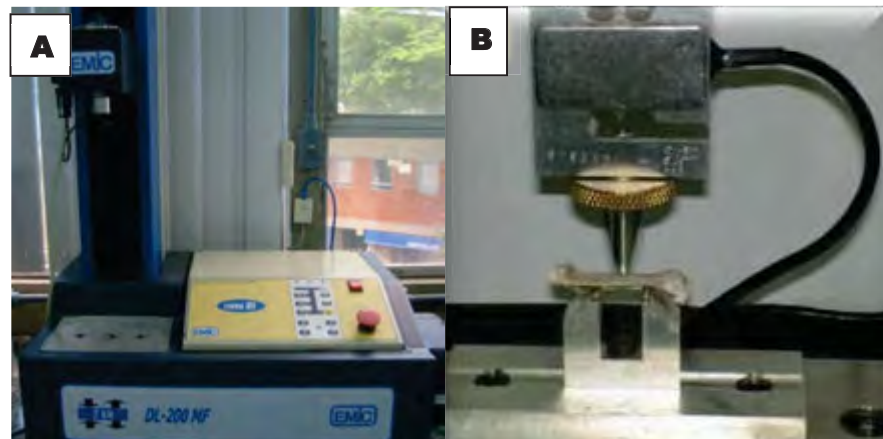


Figura 3 – A) Máquina universal de ensaios; B) Fêmur em posição na máquina para realização do teste de flexão

Por meio do programa Tesc (versão 1.1) as seguintes propriedades extrínsecas do osso cortical foram avaliadas:

- a) Força máxima (N): valor máximo da carga durante o teste;
- b) Rigidez (kN/mm): ângulo da curva força x deslocamento na região linear;

Após a fratura os ossos foram novamente colocados em solução de Ringer para posterior realização do processamento para a análise das propriedades ósseas intrínsecas.

Para avaliar as propriedades intrínsecas do osso cortical, foram realizadas secções transversais de aproximadamente 2 mm de espessura na região adjacente ao local da fratura dos fêmures. As secções foram então coradas com azul de metileno 1% (Synth<sup>®</sup>, Diadema - Brasil) por um período de 3 min e posicionadas sobre uma lâmina de vidro, com auxílio de uma lâmina de cera nº7, onde foram analisadas por um microscópio de luz (modelo 2000-C Carl Zeiss, Bernried - Alemanha) em um aumento de 20 vezes, e fotografadas em câmera digital Sony<sup>®</sup> (modelo Cybershot DSC-W5, Tokyo - Japão), acoplada ao

estereomicroscópio. A imagem de cada espécime foi armazenada em formato jpg para posterior análise.

A seguir a imagem obtida de cada espécime foi processada pelo programa *Image Tool* (versão 3.0 University of Texas Health Science Center, San Antonio - EUA), sendo determinadas as seguintes grandezas em mm (Figura 4):

- a) T= Espessura mais externa (cortical) no sentido antero-posterior;
- b) W= Largura mais externa (cortical) no sentido médio-lateral;
- c) t= Espessura mais interna (medular) no sentido antero-posterior;
- d) w= Largura mais interna (medular) no sentido médio-lateral.

De posse desses dados foi calculado o *Cross sectional momento of inertia* (CSMI) pela fórmula:

$$\text{CSMI} = \pi/64 \times [(T^3 W) - (t^3 w)]$$

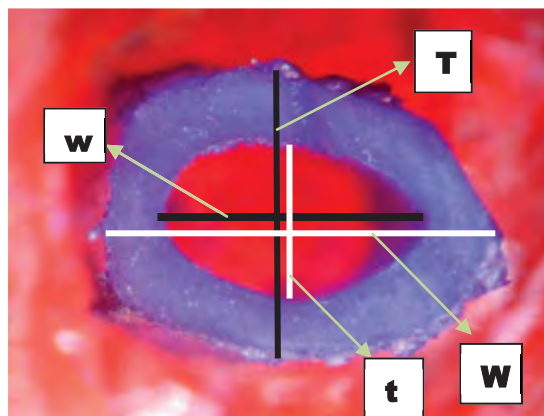


Figura 4 – Esquema das medidas necessárias para cálculo do CSMI

A partir deste resultado, pela metodologia de Hoogan et al. (1997) foram determinadas as propriedades intrínsecas de:

a) Módulo de elasticidade (MPa): Calculado pela fórmula:

$$E = (KL^3) / (48CSMI)$$

Onde K é a rigidez, L é o comprimento do span (15mm), e o CSMI é o momento de inércia.

b) Resistência máxima (ultimate strength) (MPa): valor da resistência do material no ponto de força máxima. Calculado como:

$$S = F_{max} \cdot L \cdot d / 8CSMI$$

Onde d é o diâmetro mais externo da cortical óssea.

#### 4.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. Os grupos foram submetidos a análise de variância ANOVA e teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso corporal das ratas

Os valores obtidos de pesos corpóreos dos animais indicam ganho em todos os grupos experimentais (tabela 1 e 2). Os resultados foram avaliados segundo o teste estatístico ANOVA, que demonstrou na análise intra-grupos aumento de peso significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos ovariectomizados (G1,G2,G3,G4,G5) ( $p=0,00001$ ) e falso operados (G6,G7,G8,G9,G10) ( $p=0,00001$ ) (figura 5).

A análise inter-grupos demonstra que ganho de peso obtido no período 360 dias não apresenta diferença significativa entre os grupos OVZ(G5) e SHAM(G10), já em todos os outros períodos analisados houve diferença significativa no aumento do peso entre os grupos OVZ e SHAM, sendo o grupo OVZ o que obteve um maior percentual de ganho (figura 6).

Tabela 1- Valores de média e desvio padrão do peso corpóreo inicial e final em gramas (g) das ratas ovariectomizadas e o percentual de variação (%) nos grupos experimentais

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	% variação (g)
G1	256,88 ± 15,57	299,38 ± 21,29	17,00 ± 12,56 <sup>A</sup>
G2	256,88 ± 14,12	325,62 ± 16,35	26,85 ± 3,91 <sup>AB</sup>
G3	261,38 ± 17,35	350,00 ± 34,85	33,82 ± 8,45 <sup>BC</sup>
G4	265,38 ± 23,38	390,60 ± 34,00	47,35 ± 6,38 <sup>C</sup>
G5	230,00 ± 33,00	372,50 ± 45,00	63,49 ± 22,05 <sup>C</sup>

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey  $< 0,05$ ).

Tabela 2- Valores de média e desvio padrão do peso corpóreo inicial e final em gramas (g) das ratas do grupo SHAM e o percentual de variação (%) nos grupos experimentais

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	% variação (g)
G6	276,25 ± 13,56	284,38 ± 10,50	3,48 ± 2,95 <sup>a</sup>
G7	284,38 ± 19,54	330,00 ± 27,65	15,98 ± 3,79 <sup>a</sup>
G8	267,50 ± 29,2	314,38 ± 19,90	18,64 ± 13,80 <sup>b</sup>
G9	263,75 ± 24,46	352,5 ± 34,1	34,19 ± 13,57 <sup>bc</sup>
G10	238,13 ± 14,87	347,50 ± 19,46	46,33 ± 11,07 <sup>c</sup>

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <0,05).

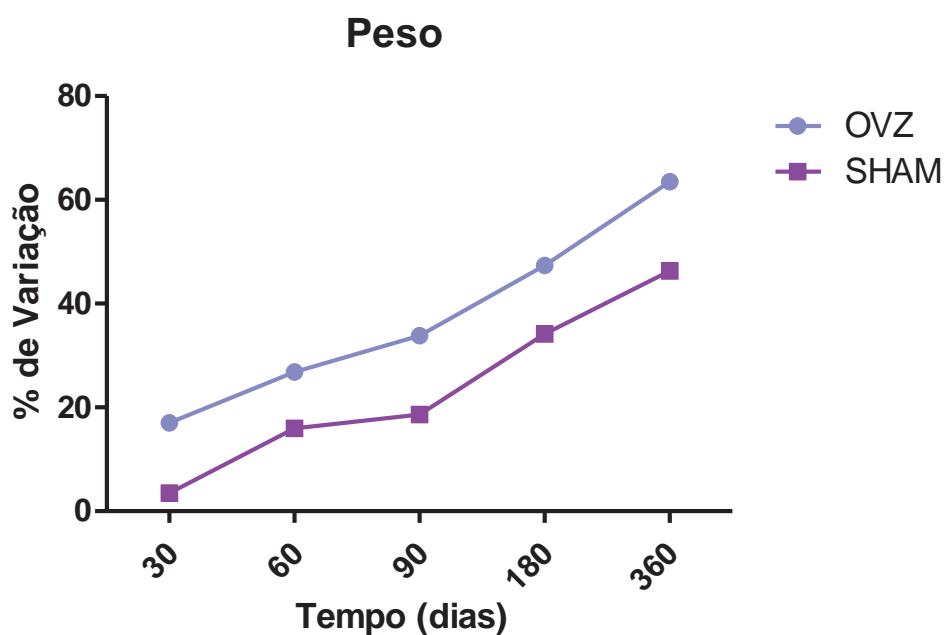


Figura 5 - Valores de médias do percentual (%) de variação do peso das ratas na avaliação intra-grupos



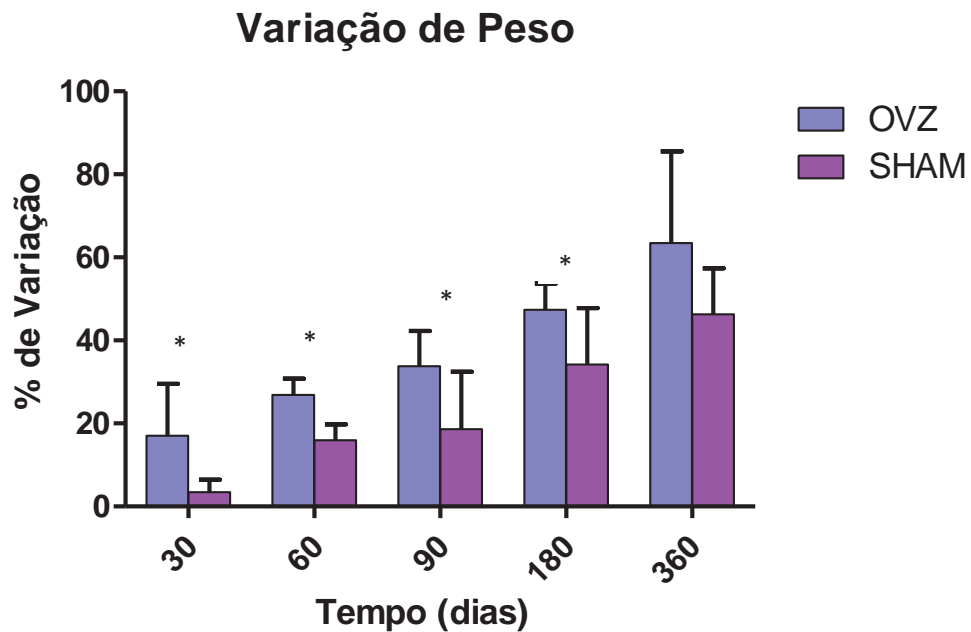


Figura 6 - Valores de média e desvio padrão do percentual (%) de variação do peso das ratas segundo análise inter-grupos. O símbolo \* indica que os grupos ovz e sham diferem entre si.

## 5.2 Densidade radiográfica dos fêmures

Os valores obtidos das médias da densidade radiográfica demonstram variedade em todos os grupos experimentais (tabela 3 e 4). O teste estatístico ANOVA demonstrou na análise intra-grupos que não houve diferença significativa entre os períodos analisados ( $p > 0,05$ ) nos grupos OVZ ( $p = 0,051$ ) e SHAM ( $p = 0,40$ ) (figura 7). Já na análise inter-grupos pode-se observar diferença estatisticamente significativa nos períodos 30 dias ( $p = 0,02 < 0,05$ ) e 90 dias ( $p = 0,02 < 0,05$ ), obtendo-se nos dois grupos maiores valores de densidade no grupo SHAM. Os demais grupos apesar de apresentarem valores de densidade radiográfica maiores no grupo SHAM do que no grupo OVZ, não se demonstraram estatisticamente significante, este fato só não é encontrado no grupo 360

dias, que apesar de ter diferença estatística insignificante apresenta maior valor de densidade no grupo OVZ do que comparado ao grupo SHAM (figura 8).

Ao levarmos em consideração todos os grupos experimentais em todos os períodos podemos observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVZ e SHAM (tratamento  $p=0,009 < 0,05$ ).

Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão da densidade óptica radiográfica nos grupos experimentais ovariectomizados

Grupo	Densidade	Período
G1	121,37 ± 13,74 <sup>A</sup>	30 Dias
G2	139,74 ± 20,53 <sup>A</sup>	60 Dias
G3	129,00 ± 10,96 <sup>A</sup>	90 Dias
G4	136,52 ± 11,75 <sup>A</sup>	180 Dias
G5	141,57 ± 12,81 <sup>A</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey  $<0,05$ ).

Tabela 4 - Valores de média e desvio padrão da densidade óptica radiográfica nos grupos experimentais SHAM

Grupo	Densidade	Período
G6	145,47 ± 22,13 <sup>a</sup>	30 Dias
G7	143,23 ± 8,60 <sup>a</sup>	60 Dias
G8	154,83 ± 25,85 <sup>a</sup>	90 Dias
G9	140,59 ± 18,67 <sup>a</sup>	180 Dias
G10	135,89 ± 18,75 <sup>a</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey  $<0,05$ ).

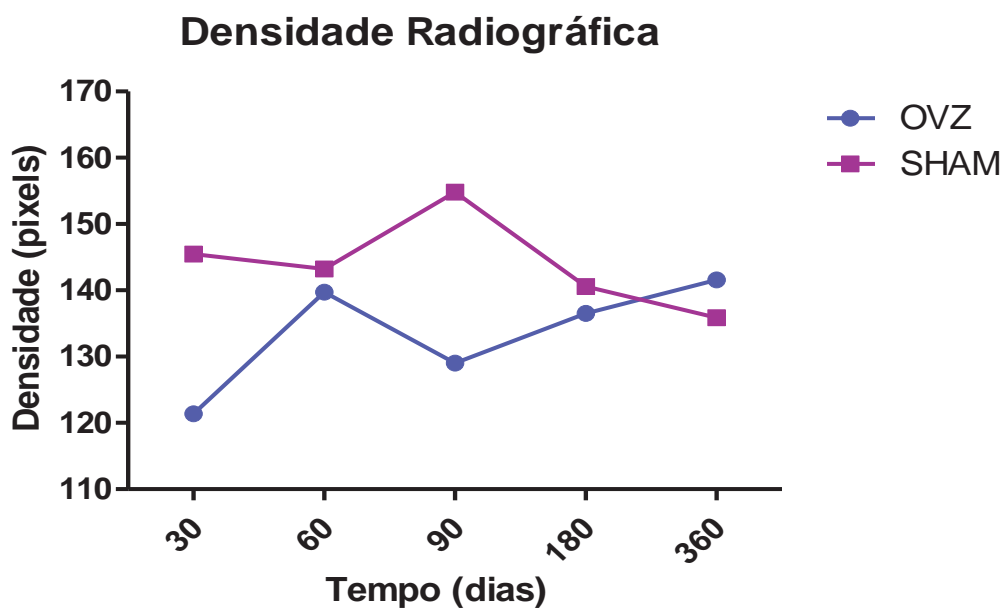


Figura 7 - Valores de médias em pixels de densidade radiográfica na avaliação intra-grupos

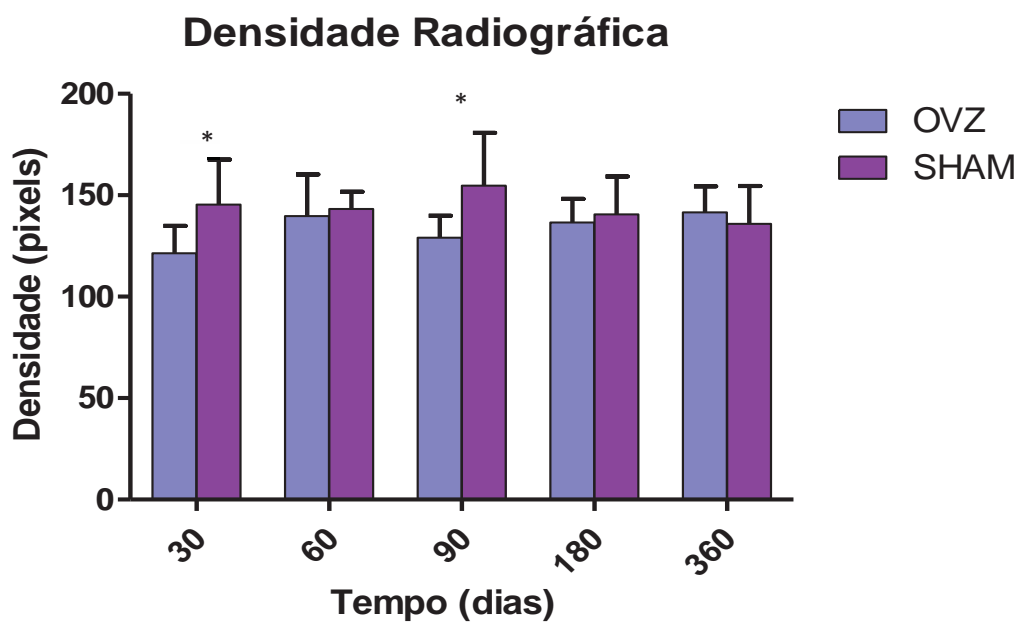


Figura 8 - Valores de média e desvio padrão em pixels da densidade radiográfica dos fêmures segundo análise inter-grupos. O símbolo \* indica que os grupos OVZ e SHAM diferem entre si.

### 5.3 Propriedades biomecânicas

#### 5.3.1 Força Máxima

Os dados de média e desvio padrão da força máxima da amostra podem ser visualizados nas tabelas 5 e 6.

O teste estatístico ANOVA demonstrou na análise intra-grupos que houve diferença significativa entre os períodos analisados ( $p < 0,05$ ) nos grupos OVZ ( $p = 0,0101$ ) e SHAM ( $p = 0,0001$ ). Sendo os períodos de 30 dias em ambos os grupos os que demonstram menores valores de força máxima (figura 9).

Na análise inter-grupos podemos observar diferença estatisticamente significante apenas no período de 30 dias ( $p = 0,04$ ). Nos outros períodos analisados os grupos ovariectomizados apresentaram menores valores de força máxima em comparação ao grupo SHAM, porém não refletiu no grau de significância (figura 10).

Tabela 5 - Valores de média e desvio padrão da propriedade biomecânica força máxima nos grupos experimentais ovariectomizados

Grupo	Força Máxima	Período
G1	91,49 ± 7,27 <sup>A</sup>	30 Dias
G2	93,62 ± 12,86 <sup>AB</sup>	60 Dias
G3	115,00 ± 13,37 <sup>B</sup>	90 Dias
G4	111,02 ± 16,62 <sup>AB</sup>	180 Dias
G5	112,75 ± 25,09 <sup>AB</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey  $< 0,05$ ).

Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão da propriedade biomecânica força máxima nos grupos experimentais ovariectomizados

Grupo	Força Máxima	Período
G6	102,66 ± 12,78 <sup>a</sup>	30 Dias
G7	103,24 ± 11,29 <sup>a</sup>	60 Dias
G8	113,42 ± 10,06 <sup>ab</sup>	90 Dias
G9	120,00 ± 14,32 <sup>bc</sup>	180 Dias
G10	130,99 ± 8,13 <sup>c</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <math>p</math> <math><0,05</math>).

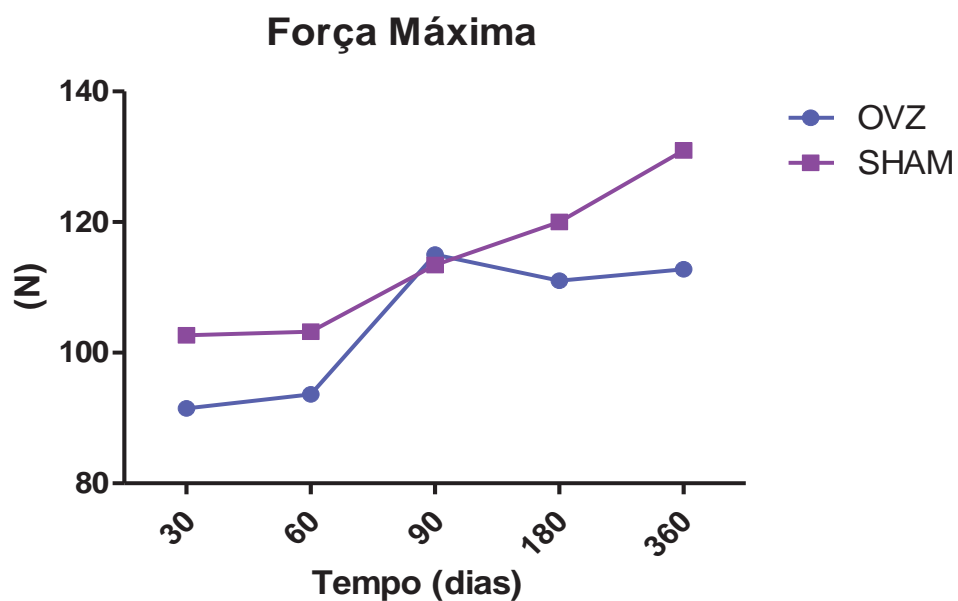


Figura 9 - Valores de médias em Newton da força máxima na avaliação intra-grupos

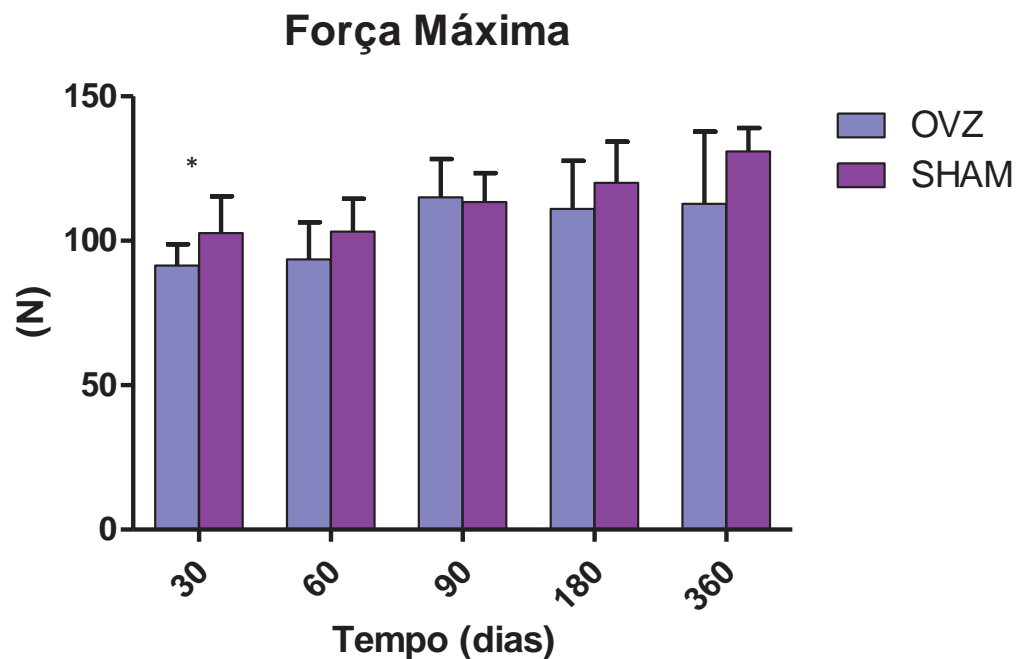


Figura 10 - Valores de média e desvio padrão em Newton da análise da força máxima dos fêmures segundo análise inter-grupos. O símbolo \* indica que os grupos OVZ e SHAM diferem entre si.

### 5.3.2 Rigidez

Os dados de média e desvio padrão da propriedade biomecânica rigidez podem ser visualizados nas tabelas 7 e 8.

O teste estatístico ANOVA demonstrou na análise intra-grupos que houve diferença significativa entre os períodos analisados ( $p < 0,05$ ) nos grupos OVZ ( $p = 0,0131$ ) e SHAM ( $p = 0,0002$ ). Sendo os períodos de 30 dias em ambos os grupos os que demonstram menores valores de rigidez. Pode-se verificar também que exceto no período 90 dias, em todos os outros períodos os valores do grupo ovariectomizado foi menor do que no grupo SHAM (figura 11).

Na análise inter-grupos podemos observar que não existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVZ e SHAM em nenhum dos períodos apresentados (figura 12).

Tabela 7 - Valores de média e desvio padrão da propriedade biomecânica rigidez nos grupos experimentais ovariectomizados

Grupo	Rigidez	Período
G1	159,63 ± 28,14 <sup>A</sup>	30 Dias
G2	170,7 ± 54,1 <sup>AB</sup>	60 Dias
G3	218,0 ± 59,7 <sup>AB</sup>	90 Dias
G4	211,1 ± 45,00 <sup>AB</sup>	180 Dias
G5	237,8 ± 50,1 <sup>B</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <0,05).

Tabela 8 - Valores de média e desvio padrão da propriedade biomecânica rigidez nos grupos experimentais SHAM

Grupo	Rigidez	Período
G6	198,6 ± 48,8 <sup>a</sup>	30 Dias
G7	200,83 ± 25,21 <sup>a</sup>	60 Dias
G8	213,23 ± 19,67 <sup>a</sup>	90 Dias
G9	232,64 ± 24,52 <sup>ab</sup>	180 Dias
G10	267,75 ± 23,39 <sup>b</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <0,05).

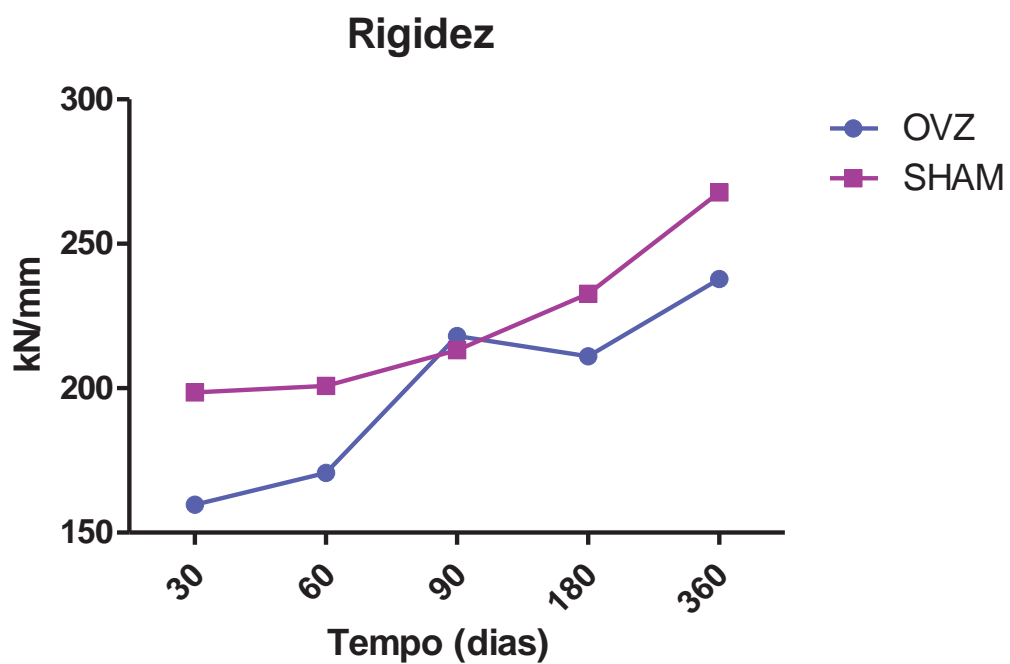


Figura 11 - Valores de médias da propriedade rigidez na avaliação intra-grupos

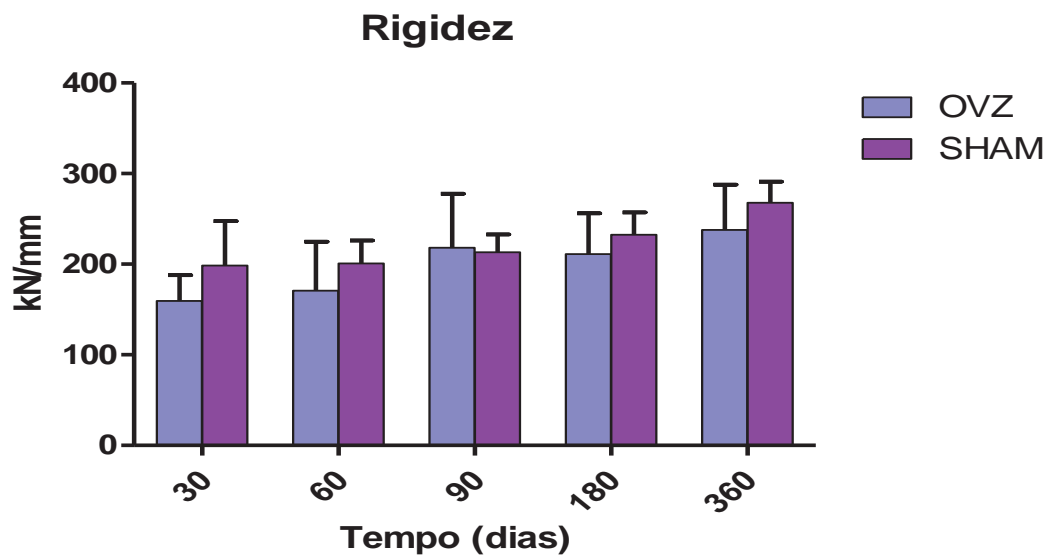


Figura 12 - Valores de média e desvio padrão da propriedade rigidez segundo análise inter-grupos.



### 5.3.3 Módulo de elasticidade (E)

Os dados de média e desvio padrão da propriedade intrínseca módulo de elasticidade podem ser visualizados nas tabelas 9 e 10.

O teste estatístico ANOVA demonstrou na análise intra-grupos que houve diferença significativa entre os períodos analisados ( $p < 0,05$ ) nos grupos OVZ ( $p = 0,0128$ ) e SHAM ( $p = 0,0003$ ). Sendo os períodos de 30 e 360 dias os únicos períodos em que o grupo OVZ apresenta maior módulo de elasticidade do que o grupo Sham (figura 13), já em todos outros períodos o grupo OVZ apresenta menor módulo de elasticidade. Apresentando-se estatisticamente significativa na análise inter-grupos o período de 60 e 90 dias (figura 14).

Tabela 9 - Valores de média e desvio padrão da propriedade módulo de elasticidade nos grupos experimentais ovariectomizados

Grupo	E	Período
G1	$2,08 \pm 0,63$ <sup>AB</sup>	30 Dias
G2	$0,75 \pm 0,30$ <sup>A</sup>	60 Dias
G3	$1,27 \pm 0,64$ <sup>AB</sup>	90 Dias
G4	$2,35 \pm 1,21$ <sup>AB</sup>	180 Dias
G5	$2,13 \pm 1,06$ <sup>B</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey  $< 0,05$ ).

Tabela 10 - Valores de média e desvio padrão da propriedade módulo de elasticidade nos grupos experimentais SHAM

Grupo	E	Período
G6	2,04 ± 1,00 <sup>a</sup>	30 Dias
G7	1,15 ± 0,31 <sup>a</sup>	60 Dias
G8	2,07 ± 0,59 <sup>a</sup>	90 Dias
G9	2,96 ± 1,19 <sup>b</sup>	180 Dias
G10	1,65 ± 0,47 <sup>a</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <math>\alpha</math>=0,05).

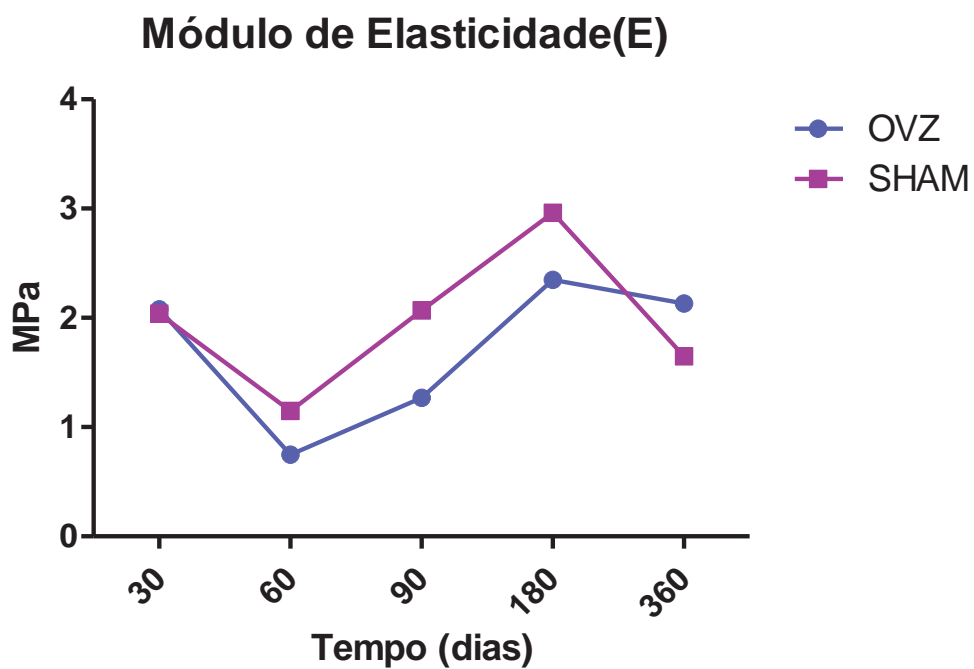


Figura 13 - Valores de médias da propriedade módulo de elasticidade na avaliação intra-grupos

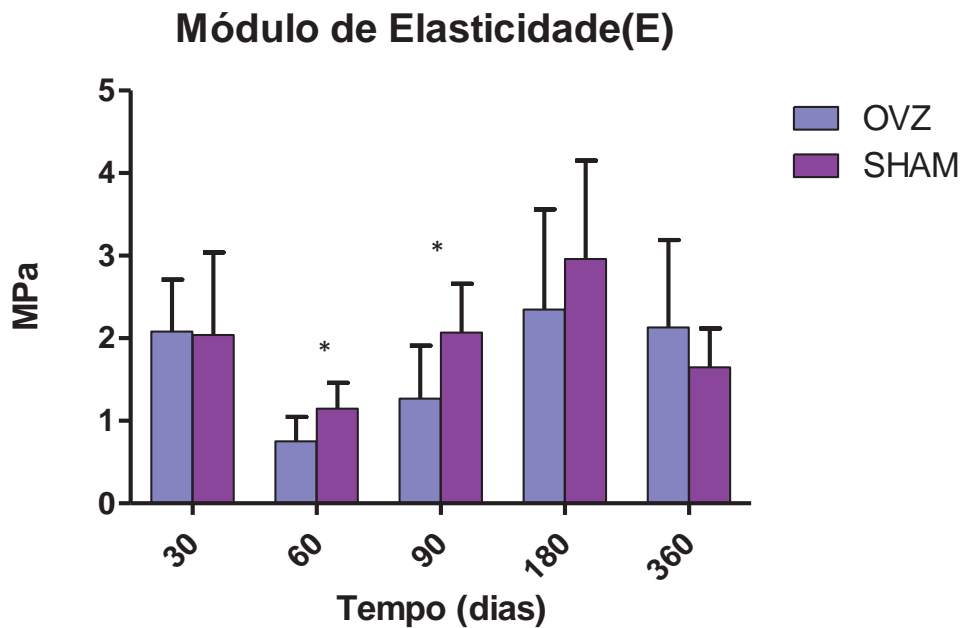


Figura 14 - Valores de média e desvio padrão do Módulo de elasticidade segundo análise inter-grupos.

#### 5.3.4 Resistência máxima (S)

Os dados de média e desvio padrão da propriedade resistência máxima podem ser visualizados na tabela 11 e 12.

O teste estatístico ANOVA demonstrou na análise intra-grupos que houve diferença significativa entre os períodos analisados ( $p < 0,05$ ) nos grupos OVZ ( $p = 0,001$ ) e SHAM ( $p = 0,001$ ). Esta análise demonstrou que em ambos grupos, o período 180 dias foi o que apresentou maiores valores de resistência, destacando-se. Nos períodos de 60 e 360 dias os valores de resistência do grupo OVZ foi maior do que no grupo SHAM, o que não acontece nos outros períodos( figura 15).

Na análise inter-grupos podemos observar que apenas no período de 90 dias tivemos diferença estatisticamente significativa( figura 15). Sendo os períodos de 60 e 360 dias os únicos períodos em que o

grupo OVZ apresenta maiores valores de resistência máxima do que o grupo SHAM (figura16).

Tabela 11 - Valores de média e desvio padrão da propriedade resistência máxima nos grupos experimentais ovariectomizados

Grupo	S	Período
G1	0,79 ± 0,32 <sup>A</sup>	30 Dias
G2	0,83 ± 0,48 <sup>A</sup>	60 Dias
G3	0,40 ± 0,40 <sup>A</sup>	90 Dias
G4	2,74 ± 0,83 <sup>B</sup>	180 Dias
G5	0,91 ± 0,91 <sup>A</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <0,05).

Tabela 12 - Valores de média e desvio padrão da propriedade resistência máxima nos grupos experimentais SHAM

Grupo	S	Período
G6	1,23 ± 0,51 <sup>a</sup>	30 Dias
G7	0,60 ± 0,20 <sup>a</sup>	60 Dias
G8	0,84 ± 0,27 <sup>a</sup>	90 Dias
G9	3,93 ± 2,73 <sup>b</sup>	180 Dias
G10	0,75 ± 0,41 <sup>a</sup>	360 Dias

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e Tukey <0,05).

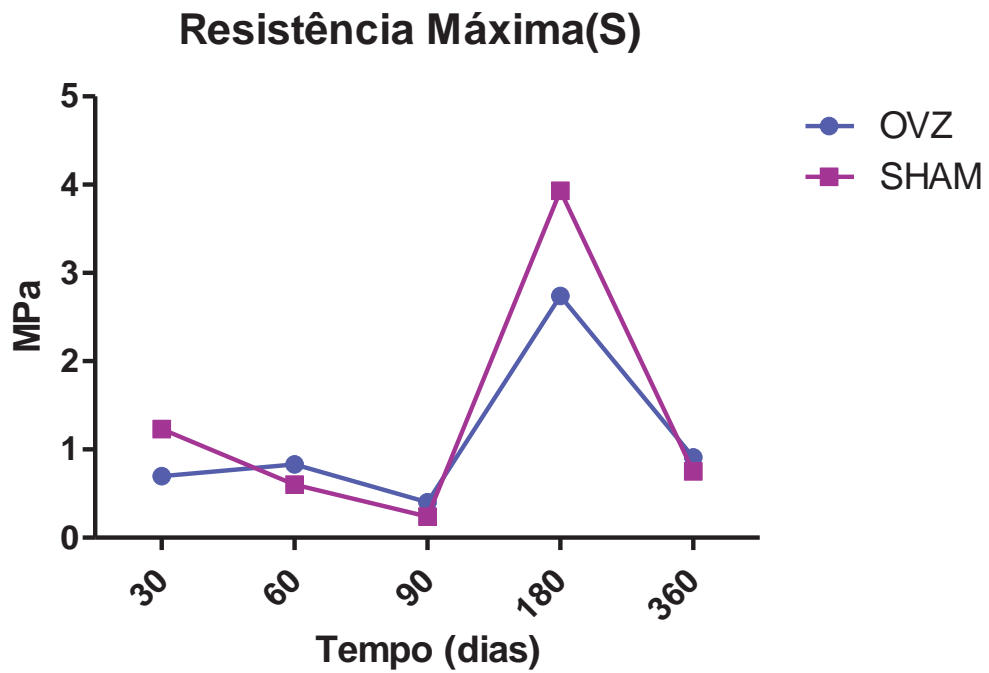


Figura 15 - Valores de médias da propriedade módulo de elasticidade na avaliação intra-grupos

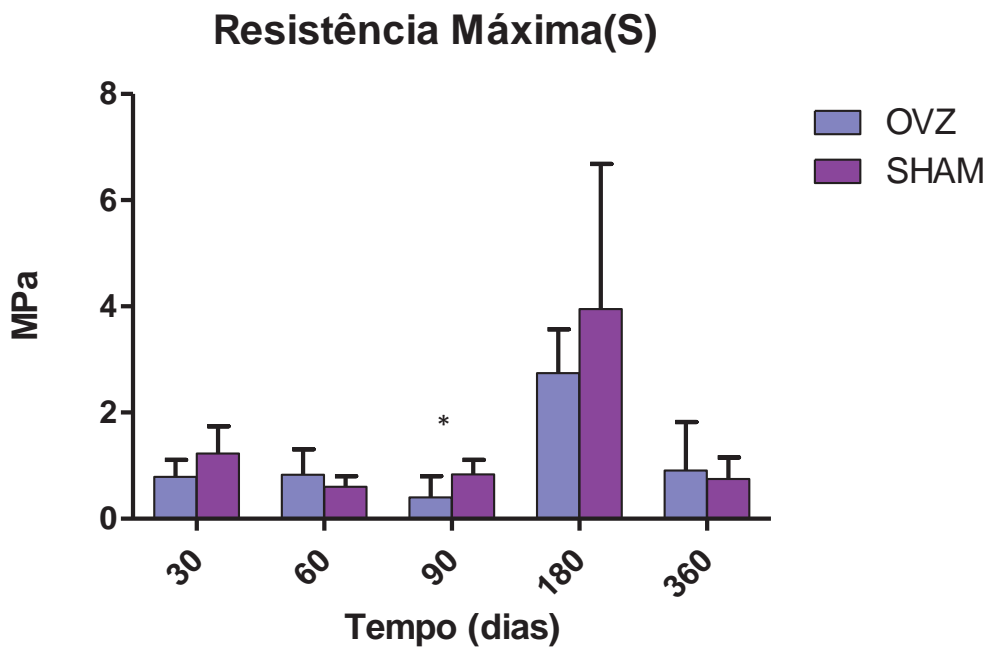


Figura 16 - Valores de média e desvio padrão da propriedade intrínseca resistência máxima segundo análise inter-grupos

## 6 DISCUSSÃO

Com o envelhecimento populacional cada vez mais a expectativa de vida vem aumentando e com isso as pessoas tem que aprender a conviver com o processo de deficiência hormonal, que cada vez dura mais tempo, e apenas entendendo como o mesmo atua no metabolismo ósseo com o passar do tempo, poderemos criar medidas efetivas para o controle desta enfermidade.

A osteoporose é uma doença silenciosa, ou seja, geralmente só se tem conhecimento de sua presença depois de uma fratura, esta onera o serviço de saúde e compromete a qualidade de vida do indivíduo (Kowalski et al., 2001; Araújo et al., 2005; Fortes et al, 2008).

Entendendo a importância do tema este trabalho se propôs a analisar o efeito da deficiência estrogênica induzida no fêmur de ratas para tanto utilizamos análise de densidade óptica radiográfica e biomecânica.

O rato foi selecionado como modelo animal para estudo da osteoporose devido à similaridade patofisiológica entre o esqueleto humano e do rato e por obedecer a critérios básicos como fácil manuseio, baixo custo, e passibilidade de reprodução da doença e seus diversos tratamentos. Além disso, os protocolos para indução da doença são rápidos e já bem estabelecidos (Lelovas et al., 2008).

O estrógeno é um hormônio que compõe o sistema reprodutor masculino e feminino, produzindo numerosas ações fisiológicas, tendo papel fundamental no metabolismo ósseo (Kuiper et al., 1997; Ruggiero; Likis, 2002; Khosla et al., 2005; Amadei et al., 2006).

Um dos principais mecanismos pelo qual esse hormônio atua no osso é através da diferenciação dos osteoclastos tanto direta

quanto indiretamente. O estrógeno também regula a diferenciação e formação dos osteoblastos modulando a produção de citocinas osteoclastogênicas (Srivastava et al., 2001).

Esse hormônio também apresenta um importante mecanismo atuando na reabsorção óssea promovendo a apoptose de osteoclastos maduros bem como de seus precursores (Hughes et al., 1996; Fountas et al., 2004).

A propriedade mecânica força máxima demonstrou que o grupo SHAM precisou de maior força para fratura do fêmur do que quando comparada os animais ovariectomizados estando estes dados de acordo com os encontrados com Comelekoglu et al. (2006), que concluiu em seus estudos que a ovariectomia causa redução da densidade mineral óssea e propriedades mecânicas. Estes dados também são encontrados nos estudos de Melo; Gomide, 2005; Netto et al., 2006; Martynetz et al., 2010. Porém Jiang et al. (2008) que demonstrou que a ovariectomia apesar de induzir hiperfagia e aumento de peso nas ratas não interfere na massa óssea ou nas propriedades mecânicas.

Assim como o esperado a força máxima e a densidade radiográfica nos animais com períodos de sacrifício de 30 e 90 dias apresentaram diferença estatística entre os grupos OVZ e SHAM, fato este que podemos relacionar com o menor ganho de peso desses animais quando comparados aos animais com mais de 90 dias pós ovariectomia, uma vez que a gordura corpórea é relacionada a um fator protetor contra osteoporose.

Abrahão et al. (2006) verificou em seu estudo que a propriedade biomecânica força máxima apresenta diferenças significativamente diferentes entre os grupos OVZ e SHAM e que o mesmo não ocorre com a propriedade rigidez. Fato este explicado pelo autor como tempo insuficiente para alterar proporcionalidade entre o suporte de carga e a deformação correspondente do material na fase elástica, já que seu estudo durou apenas 9 semanas. Assim como no

estudo de Abrahão et al. (2006), nossos estudos também demonstraram que apesar de apresentar resultados de força máxima estatisticamente significantes no período de 30 e 90 dias, essa significância não foi refletida nos outros parâmetros biomecânicos, tal como rigidez.

Trabalhos na literatura utilizando fêmur e vértebras lombares demonstram que ratas submetidas a ovariectomia apresentam menor densidade mineral óssea (BMD) quando comparadas ao grupo controle, porém as propriedades biomecânicas do fêmur não diferiram entre os grupos (Orrico et al., 2007; Jiang et al., 2008).

Vários estudos têm mostrado que a redução sérica de estrógeno está relacionada a aumento da ingestão de alimentos (Yoned et al., 1998; Chen; Heiman, 2001; Colombo, 2004). Segundo Chen; Herman (2001) o aumento de peso decorrente da hiperfagia causada pela ovariectomia ocorre tanto na massa magra, quanto no tecido gorduroso dos animais. Baseando-se nessas literaturas, o sucesso da ovariectomia em reduzir os níveis de hormônios ovarianos em nosso trabalho pôde ser avaliado através das alterações de peso corporal dos animais.

Estudos demonstram que a esse aumento na ingestão de alimentos é devido a tentativa de manutenção da homeostase frente ao desequilíbrio hormonal, uma vez que o estrogênio pode atuar no metabolismo lipídico aumentando a lipogênese e diminuindo a lipólise (Heine et al., 2000; Jones et al., 2000; Torrezan et al., 2008). Outro fator que pode interferir no aumento do peso de animais ovariectomizados é a diminuição da secreção de leptina, uma citocina secretada por células adiposas que tem o estrógeno como um de seus fatores reguladores, e é um dos moduladores da ingestão de alimentos (Vasconcellos et al., 2005; Sousa et al., 2009; Ignácio et al., 2009).

O aumento de peso observado nas ratas ovariectomizadas ainda pode ser explicado como um mecanismo de compensação estrogênica, uma vez que os adipócitos são um dos responsáveis pela aromatização da P450, que converte a



androstenediona em estrona, o estrógeno mais predominante durante o período pós-menopáusicos (Wajchenberg, 2000).

Em nosso estudo também notamos um aumento significativo no peso corporal de todos os animais, e que mesmo pareando a quantidade de ração recebida pelos grupos ovariectomizados e falso-operados (SHAM) o aumento foi maior nas ratas ovariectomizadas quando comparadas as SHAM operadas, estes dados também foram encontrados em outros estudos que utilizaram ratas ovariectomizadas e Sham operadas (Kimura et al., 2002; Amadei, 2007; Senra, 2009; Zoth et al., 2010; Marchini, 2010).

A análise de imagens é um método não invasivo para determinação da perda óssea. O método para avaliação da diminuição da massa óssea e diagnóstico de osteoporose mais utilizado ao redor do mundo é a densitometria óssea, pois quando comparada a outros métodos apresenta grande precisão e segurança a um custo acessível (Meirelles, 1999).

Muitos estudos, entretanto, utilizam os mais diversos métodos para análise de imagens, como radiografia convencional, ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética para avaliação da perda óssea encontrada na deficiência estrogênica (Giaveresi et al., 2004; Wagner, 2005; Damilakis et al., 2010).

Em nosso estudo decidimos avaliar a perda óssea resultante da deficiência hormonal através da análise da densidade radiográfica, pois estudos demonstram ser um método eficiente e de baixo-custo, além de ser um equipamento a que temos facilidade de acesso (Silva et al., 2007; Hernandez et al., 2011).

Na análise da densidade radiográfica observou-se que os grupos OVZ obtiveram menores valores de densidade radiográfica quando comparados ao grupo Sham, estando estes resultados de acordo com o esperado, assim como nos estudos de Netto et al., 2006; Zecchin et al., 2006; Hernandez et al., 2011.

O tempo utilizado mostrou-se eficiente para observarmos em longo prazo os efeitos da deficiência hormonal, confirmando que os maiores efeitos sobre o tecido ósseo ocorrem nos primeiros 90 dias após a realização da ovariectomia, assim como no clássico estudo de Wronski et al., 1989.

Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho podemos observar que a deficiência estrogênica provoca perda da massa óssea e os parâmetros utilizados quando analisados isoladamente não refletem a realidade encontrada no tecido ósseo, desta forma o ideal é que ao se analisar o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas sejam levados em consideração vários parâmetros para maior confiabilidade de resultados.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste experimento pudemos concluir que:

a) os períodos em que a deficiência hormonal apresentou efeitos significativos sobre o tecido ósseo é o de 30, 60 e 90 dias após a ovariectomia; sendo estes períodos ideais para indução da doença, uma vez que com o decorrer de tempo os efeitos da deficiência hormonal tornam-se menos significativos;

b) as propriedades biomecânicas apresentaram íntima relação com a densidade óptica radiográfica, refletindo seus valores, logo quanto menor for a densidade do osso maior será a chance de fratura do mesmo;

c) a ovariectomia induz um aumento na massa corporal das ratas em todos os períodos analisados.

## 8 REFERÊNCIAS \*

Abrahão GS, Shimano AC, Picado CHF. Ação da atividade física sobre a propriedades mecânicas dos fêmures e tíbias de ratas osteopênicas. *Acta Orto Bras*. 2006;14(5):242-5.

Alekna V, Tamulaitiene M, Krasauskiene A. Diagnostics and treatment of osteoporosis. *Endocrinology in Lithuania*. 2003;11:94-108.

Amadei SU. Efeito de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea resultante da periodontite experimental em ratas [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista;2007.

Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab*. Fev 2006;42(1):5-12.

Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev Odontol UNESP*. 2006;35(2):191-8.

Araújo DV, Oliveira JHA, Bracco OL. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49(6):897-901.

Armada L, Nogueira CRR, Neves UL, Souza PS, Detogne JP, Armada-Dias L, et al. Mandible analysis in sex steroid-deficient rats. *Oral Diseases*. 2006;12:181–6.

---

\*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Balash J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Human Reproduction Update*. 2003,9(3):207-22.

Bandeira F., et al. *Osteoporose*. Rio de Janeiro: Médica e Científica; 2000. 390 p.

Baum E, Peters KM. The diagnosis and treatment of primary osteoporosis according to current guidelines. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2008;105(33):573–82.

Beltrão KI, Camarano AA, Kanso S. *Dinâmica populacional brasileira na virada do século XX*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Econômica Avançada (IPEA);2004.

Brandão C, Hauache OM. *Manual de doenças osteometabólicas*. Disponível em: [www.fleury.com.br](http://www.fleury.com.br). Acesso em 22 jul. 2009. São Paulo: Fleury;2009.

Brown JP, Josse RG. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Can Med Assoc J*. Nov 2002;167(10):p.s1-s34.

Caioroli D. Deficiência androgênica no envelhecimento masculino. *AMRIGS*. Porto Alegre. Out/Dez 2004;48(4):291-9.

Carvalho JAM, Garcia RA. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. *Cad. Saúde Pública*. Mai/Jun 2003;19(3):725-33.

Carvalho JAM, Rodríguez-Wong LL. A transição da estrutura etária da população brasileira na primeira metade do século XXI. *Cad. Saúde Pública*. Mar 2008;24(3):597-605.

Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Feb 2001,20(2):315-22.

Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. The impact of methods for estimating bone health and the global burden of bone disease. *Salud Publica Mex.* 2009; 51 supl 1:S38-S45.

Colombo CED. Efeitos do estrógeno e da progesterona na regeneração da glândula parótida após atrofia por ligadura do ducto excretor: estudo histológico e imuno-histoquímico em ratas após ovariectomia [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP – Univ Estadual Paulista; 2004.

Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin NO, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol.* 2007;26:380–4.

Damilakis J, Adams JE, Guglielmi G, Link TM. Radiation exposure in X-ray-based imaging techniques used in osteoporosis. *Eur Radiol.* 2010;20:2707-14.

Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone.* Jan 1995;16(1):157-61.

Diez-Perez A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). *Arq Bras Endocrinol Metab.* Aug 2006;50(4):720-34.

Einhorn TA. Biomechanics of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p.25-37.

Faloni APS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. *Rev Odontol UNESP* 2007;36(2):181-8.

Ferretti JL, Frost HM, Gasser J, High W, Jee WSS, Jerome C, et al. Perspectives on osteoporosis research: its focus and some insights from a new paradigm. *Calcif Tissue Int.* Dec 1995;57(6):399-404.

Ferretti JL, Fointry GR, Capozza RF, Mondelo N, Peluffo V, Chiappe A, et al. Efectos de los bifosfonatos sobre la eficiencia mecánica de esqueletos normales u osteopenicos. *Medicina (Buenos Aires)*. 1997 Supl I:83-92.

Folwarczna J, Sliwinski L, Cegiela U, Pytlic M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Nowińska B, et al. Raloxifene similarly affects the skeletal system of male and ovariectomized female rats. *Pharmacological Reports*. May 2007;59:359-68.

Fortes EM, Raffaelli MP, Bracco OL, Takata ETT, Reis FB, et al. Elevada mortalidade e reduzida taxa de diagnóstico de osteoporose em idosos com fratura de fêmur proximal na cidade de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab*.2008;52(7):1106-14.

Fountas L, Anapliotou M, Kominakis A, Sekeris CE, Kassi E, Moutsatsou P. Estrogen receptor alpha gene analysis in osteoporosis and familial osteoporosis. *Osteoporosis Int*. Dec 2004;15(12):948-56.

Frazão P, Naveira M. Fatores associados à baixa densidade mineral óssea em mulheres brancas. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(5):740-8.

Frazão P, Naveira M. Prevalência de osteoporose: uma visão crítica. *Rev Bra Epidemiol*. 2006;9(2):206-14.

French L, Smith M, Shimp L. Prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women. *J Fam Pract*. Oct 2002;51(10):872-5.

Fugita T, Ohtani J, Shigekawa M, Kawata T, Kaku M, Kohono S, et al. Influence of sex hormone disturbances on the internal structure of the mandible in newborn mice. *Eur J Orthod*. Jan 2006;28:190-9.

Giaveresi G, Borsari V, Fini M, Martini L, Tschon M, et al. Different diagnostic techniques for the assessment of cortical bone on osteoporotic animals. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2004;58:494-9.

Gilbert SM, Mckiernan JM. Epidemiology of male osteoporosis and prostate cancer. *Cur Op Urol*. Jan 2005;15(1):23-7.

Goldenberg E. Osteoporose Masculina. São Paulo: Atheneu. 2009.

Guarniero G, Oliveira LG. Atualização: no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. Rev Bras Ortop. Set 2004;39(9):477-85.

Guyton AC, Hall JE. Hormônio paratireóideo, Calcitonina, Metabolismo do Cálcio e do Fósforo, Vitamina D, Ossos e Dentes. In: Tratado de Fisiologia Médica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2002. p.895-910.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke OS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12729-34.

Hernández RAM, Ohtani J, Fugita T, Sunagawa H, Kawata T, et al. Sex hormones receptors play a crucial role in the control of femoral and mandibular growth in newborn mice. Eur J Orthod. Feb 2011.

Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. Dentomaxillofac Radiol. Jan 1997; 26(1):3-15.

Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats: A study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. Aug 1997;21(5):809-16.

Hoyer HE, Lippert H. Biomechanical changes in long limb bones of HAN-Wistar rats during the postnatal development. Anat Embryol. 1982;164(1): 101-11.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . Nature Medicine. Oct 1996;2(10):1132-6.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/perfilidoso/perfidosos2000.pdf>



Ignácio DL, Frankenfeld TGP, Fortunato RS, Vaisman M, Saar JP, et al. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53(3):310-7.

Jagelaviciene E, Kubilius R. The relationship between general osteoporosis of the organism and periodontal diseases. *Medicina (Kaunas).* 2006;42(8):613-8.

Jiang GZ, Matsumoto H, Gunji MHA, Hakozaiki K, Fujii YAA. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab.* 2008;26:130-7.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 7;97(23):12735-40.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 111-28.

Kazanavicius G, Pavilionyte S, Sapokaite G, Kazanaviciene V. The analysis of the changes in mineral bone density in different age groups of females in dual energy roent genological absorptiometry studies of the espine and ultrasound studies of hucklebone. *Endocrinology in Lithuania.* 2003;11:49-53.

Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats in related to a decrease in the expression. of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 1; 290(4):1349-53.

Khosla S, Riggs BL, Robb RA, Camp JJ, Achenbach SJ, Oberg AL, et al. Relationship of volumetric bone density and structural parameters different skeletal sites to sex steroid levels in women. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep 2005;90(9):5096–5103.

Kowalski SC, Sjenzfeld VL, Ferraz MB. Utilização dos recursos e custos em osteoporose. *Rev Ass Med Brasil.* 2001,47(4):352-7.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinol.* Jan 2003;138(3): 24-8.

Leão LMCSM, Duarte MPC, Farias MLF. Insuficiência androgênica na mulher e potenciais riscos da reposição terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* Abr 2005;49(2):205-16.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. . The laboratory rat model as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Medicine.* Oct 2008;58(5):424-30.

Malosso TG. Análise de um modelo de processo de instalação de osteopenia em ossos corticais de ratas ovariectomizadas [dissertação] Escola de Engenharia de São Carlos- USP -Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004.

Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* Feb 1995;332(5):305-11.

Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* Aug 1995;17(2) suppl 1:563-7.

Marchini AMPS. Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a variação da estequiometria da hidroxiapatita na crista óssea alveolar de ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP- Univ Estadual Paulista; 2010.

Martini LA, Moura EC, Santos LC, Malta DC, Pinheiro MM. Prevalência de osteoporose no Brasil, 2006. *Rev Saúde Pública.* 2009; 43(supl 2):107-16.

Martynetz FA, Bondo-Simões MLP, Martynetz JR, Martynetz TD, et al. Avaliação tomográfica e tensiométrica de fêmures de ratas ooforectomizadas submetidas à terapia de reposição hormonal. *Rev Bras Ortop.* 2010;45(1):40-5.

Meirelles ES. Diagnóstico por imagem na osteoporose. Arq Bras Endocrinol Metab. Dez 1999;43(6):423-27.

Mello LCP, Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. Rev. Nutr., Campinas. 2005 set/out;18(5):593-600.

Modesto Filho J, Azevedo LAP, Azevedo LCP. Tratamento da osteoporose. J Bras Med. Nov 1996;71(5):77-9.

Montecinos BR, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. Acta Bioquím Clín Latinoam 2009; 43(2):177-93.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Consensus Development Program. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. NIH Consensus Statement. 2000 ;17(1):1-45. Disponível em : <http://www.consensus.nih.gov/cons/111/111statement.pdf>. Acesso em: Set. 2005.

Netto CC, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka CK. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. Rev Ci med biol. set/dez 2006; 5(3):231-238.

Orrico SR, Giro G, Gonçalves D, Takayama L, Pereira RM. Influence of the period after ovariectomy on femoral and mandibular bone density and on induced periodontal disease. J Periodontol. Jan 2007;78(1):164-9.

Patel SH, Murphy KP. Fractures of the proximal femur: correlates of radiological evidence of osteoporosis. Skeletal Radiol. Apr 2006; 35(4):202-11.

Pinheiro MM, Neto ETR, Machado FS, Omura F, Yang HK, et al. Risk factors for osteoporotic fractures. Rev Saúde Pública. 2010;44(3):479-85.

Prevelic G. Osteoporosis in men. JRSM. Dec 2001; 94(12):620-3.

Ramalho AC, Lazaretti- Castro M, Hauache O, Vieira JG, Takata E, Cafalli F, et al. Osteoporotic fractures of proximal femur: clinical and epidemiological features in a population of the city of São Paulo. *Rev Paulista Medi.* Mar 2001;119(2):48-53.

Rang. *Farmacologia.* 5 ed. Rio de Janeiro: Americana; 2004.904 p.904.

Riera-Espinoza G. Epidemiology of osteoporosis in Latin America 2008. *Salud Publica Mex.* 2009;51 suppl 1:S52-S55.

Riggs BL, Khosla S, Melton JL. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine Rev.* Jun 2002;23(3):279-302.

Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Women's Health.* May/ Jun 2002;47(3):130-8.

Russo LAT. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* Ago 2001;45(4):401-6.

Senra GS. Avaliação da qualidade óssea no reparo de defeitos ósseos sob a ação de risedronato e da deficiência estrogênica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2009.

Silva ARS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia AMP, Sundefeld MLMM. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. *Rev Odonto Ciência.* 2007; 22(55):77-81.

Sousa M, Brás-Silva C, Leite-Moreira A. O papel da leptina na regulação da homeostasia energética. *Acta Med Port.* 2009;22:291-8.

Souza SA. *Ensaio mecânicos de materiais metálicos* 3. ed. São Paulo: Edgar Blücher; 1977.

Souza SA. Ensaios mecânicos de materiais metálicos: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo, Ed. Edgar Blücher. 1982.

Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down regulating receptor activator of NF kB ligand (RANKL) induced JNK activation. J Biol Chemistry. Mar 2001; 276(12):8836-40.

Torrezan R, Gomes RM, Ferrarese ML, Melo BH, et al. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52(9):1489-96.

Tortora GJ, Grabowski SR. O sistema esquelético: tecido ósseo. In: Fisiologia: Princípios de anatomia e fisiologia. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002; p.145-65.

Turner RT, Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. Alcohol Res Health. 2001;25(4):276-81.

Vasconcellos LS, Sabino KR, Petroianu A, TCBC-MG. Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. Rev Col . Bras. Cir. 2005; 32(3):132-5.

Vasikaran SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2008; 45(2):221–58.

Vondracek SF, Hansen LB. Current approaches to the management of osteoporosis in men. Am J Health Syst Pharm. Sept 2004; 61(17):1801-11.

Wajchenberg BL. Tecido adiposo como glândula endócrina. Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44(1):13-20.

Wagner S, Stäbler A, Sitttek H, Bonel H, Laeverenz G, Reiser MF, et al. Diagnosis of osteoporosis: visual assessment on conventional versus digital radiographs. Osteoporos Int. 2005;16:1815-22.

Wronsky TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int.* 1989;45: 360-66.

Yazbek MA, Neto JFM. Osteoporose e outras doenças metabólicas no idoso. *Einstein.* 2008; 6(Supl 1):S74-S8.

Ynsa MD, Ager FJ, Alves LC, Zubeldia MA, Millán JC, Pinheiro T. Elemental distributions in femoral bone of rat under osteoporosis preventive treatments. *J Microsc.* Dec 2006;224(3):298-305.

Yoneda N, Saito S, Kimura M, Yamada M, Iida M, Murakami M, et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm Metab Res.* May 1998;30(5):263-75.

Zecchin KG, Pereira MC, Vargas PA, Graner E, Jorge J. Conventional X-ray densitometry detects osteopenia in ovariectomized young rats. *Short Communication. Braz J Oral Sci.* Jan/Mar 2004; 3(8):425-27.

Zioupou P, Curry JD, Hamer AJ. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research.* Feb 1999; 45(2):108-16.

Zoth N, Weigt C, Laudénbach-Leschowski U, Diel P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Oct;122(1-3):100-5.

## ANEXO A – Certificado do comitê de ética

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Av. Eng. Francisco José Langot, 777 - Jd. São Diniz  
C.P. 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9637  
Fax: (12) 3947-9010 - [mar910@fod.uepa.br](mailto:mar910@fod.uepa.br) - [Quisken@fod.uepa.br](mailto:Quisken@fod.uepa.br)

---



**CERTIFICADO**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**  
**Envolvendo Animais**

---

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 011/2010-PA/CEP, sobre "Estudo longitudinal da deficiência estrogênica no fêmur de ratas." sob responsabilidade de ERIKA CRISTINA SBRISSE PEREIRA, tendo como orientadora a Profa. Adjunto ROSILENE FERNANDES DA ROCHA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 09 de junho de 2010

---

**Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO**  
**Coordenadora**