

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FISIOLOGICAS

MELISE JACON PERES UENO

Efeitos do desuso e da deficiência de
estrógeno sobre a microarquitetura óssea e
suas propriedades biomecânicas

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia do *Campus* de
Araçatuba - Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
UNESP, para obtenção do título de
“Mestre em Ciências Fisiológicas”.
Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson
Quirino Louzada

Araçatuba

2015

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Melise Jacon Peres Ueno

Efeitos do desuso e da deficiência de
estrógeno sobre a microarquitetura óssea e
suas propriedades biomecânicas

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação Multicêntrico
em Ciências Fisiológicas para obtenção do
título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson
Quirino Louzada

Araçatuba

2015

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

U22e

Ueno, Melise Jacon Peres.

Efeitos do desuso e da deficiência de estrógeno sobre a microarquitetura óssea e suas propriedades biomecânicas / Melise Jacon Peres Ueno. - Araçatuba, 2015

54 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

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

Orientador: Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada

1. Doenças ósseas metabólicas 2. Ratos 3. Ovariectomia
4. Estrogênios - Deficiência I. Título.

CDD 612

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus pelo seu amor incondicional que tem me sustentado a cada dia.

Ao meu pai, João Miguel (*in memoriam*) e à minha mãe, Ana Clara, por todo seu amor e apoio incondicional. Uma guerreira que tem me inspirado a cada dia, que mesmo só, nos influenciou com sua dedicação à educação, mostrando-nos que tudo é possível se persistirmos e lutarmos para alcançar nossos objetivos com lealdade, honestidade, humildade, caráter e fé em Deus, sem os quais não seria o que sou.

Ao meu padrasto, Douglas Correa, pelo incentivo e amizade.

Ao meu irmão, Michel, pela amizade, companheirismo e amor incondicional.

A meu marido, Gustavo, pelo seu amor, amizade, companheirismo, paciência, apoio, sabedoria ao dar bons conselhos, além das viagens para as faculdades onde foram feitas as análises ósseas, idas ao laboratório e ajuda nas madrugadas com experimentos e análises. Você tem me mostrado a cada dia o quanto sou feliz por estar ao seu lado e agradeço a Deus pelo privilégio de ter você.

Aos meus sogros, Jorge e Maria de Lourdes, e aos meus cunhados, Rogério e Fernanda, por todo carinho, amor, incentivo, além dos mimos que recebo constantemente.

Aos meus avós, Miguel, Ilma e Sebastiana, por me fazerem tão feliz com simples gestos de amor, um amor inesgotável.

Às minhas tias, tios e primos, por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Aos meus amigos, Alessandra Yumi, Veridiana, Bianca, Larissa, Vanessa, Ana Paula, Jéssica, Janaína, Camila, Natália, Rebeca, Letícia, Marise, Carol, Vinícius, Guilherme, Carlos Eduardo, Branco, Fernando e Henrique pela lealdade, carinho, conversas e por acreditarem e torcerem por mim.

Vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada a todos. Eu amo muito vocês!

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, professor Mário Jefferson Quirino Louzada, não só pela orientação científica, mas por todo carinho que recebi nesses anos como professor e amigo. Com toda certeza, o senhor permitiu que esses anos fossem menos estressantes e tumultuados devido a sua alegria, paciência e muita bondade. Agradeço também por todos seus conselhos, que para mim foram e são valiosos, pois fizeram com que eu acreditasse na ciência e na pesquisa.

À professora Rita Cássia Menegati Dornelles, que mesmo não sendo minha coorientadora pôde fazer esse papel com muito êxito, carinho, atenção e disposição. Agradeço também por todos seus conselhos e direcionamentos, sem os quais não estaria concluindo meu mestrado.

À professora Sandra Helena Penha de Oliveira por todas as vezes que cedeu espaço em seu laboratório, sempre muito solícita e disposta a ajudar com as análises de expressão gênica, além de toda atenção, preocupação e carinho que sempre dispensa aos alunos.

Ao professor Antônio Hernandes Chaves Neto que gentilmente cedeu espaço em seu laboratório para as análises bioquímicas e pôde ajudar com o experimento juntamente com seus alunos.

A todos os professores do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo apoio e disponibilidade.

À professora Cárís Maroni Nunes do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, por todas as vezes que cedeu espaço em seu laboratório, além dos conselhos e direcionamentos.

Aos professores Sérgio Diniz Garcia e Wagner André Pedro da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pela amizade, conselhos e incentivo.

Ao técnico e amigo Pedro Luiz Florindo, por toda ajuda durante o trabalho, além da alegria que nos traz todos os dias.

A todos os meus colegas de departamento, em especial, à Camila Garcia, Camila Pereira, Carluci, Victor, Larissa, Ângela, Fernanda e Ronaldo que me ajudaram em alguma etapa deste trabalho com muita boa vontade.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Wellington, Márcio, Carolina, Ronaldo e Bruna por toda ajuda e companheirismo.

A todos vocês, muito obrigada, foi muito bom poder compartilhar esses anos com vocês.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade e privilégio de realizar este curso.

À Diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Titular Wilson Roberto Poi pelo apoio.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio nas viagens para realização das disciplinas.

A todos os funcionários da UNESP, muito obrigada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

PERES-UENO, MJ. Efeitos do desuso e da deficiência de estrógeno sobre a microarquitetura óssea e suas propriedades biomecânicas. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Resumo

O objetivo desse estudo foi analisar se há diferenças no efeito do desuso e da deficiência de estrógeno sobre o tecido ósseo trabecular e cortical, e se estes efeitos influenciam na qualidade do tecido ósseo aumentando sua fragilidade. Para este estudo, 30 ratas Wistar com 19 semanas de idade foram distribuídas nos grupos: controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX). As análises da densidade óssea *in vivo* (DXA) dos fêmures e tíbias e as dosagens plasmáticas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, TRAP (espectrofotometria) e E₂ (ELISA) foram realizadas no início e fim do experimento, com 19 e 27 semanas de idade respectivamente. Na 27^a semana, os fêmures e as tíbias foram desarticulados e armazenados para avaliar a microestrutura do osso trabecular e cortical (microtomografia computadorizada), além das propriedades biomecânicas do colo femoral e da diáfise femoral e tibial (ensaio mecânico). O grupo HLU apresentou diminuição na concentração plasmática de cálcio e atividade da fosfatase alcalina total, diminuição na DMOa do fêmur com aumento na porosidade cortical e diminuição na resistência óssea, entretanto, não foram observadas estas alterações na tíbia. O grupo OVX apresentou diminuição nas concentrações plasmáticas de cálcio, diminuição da DMOa do fêmur, deterioração trabecular no fêmur e na tíbia, com maior deterioração nas trabéculas ósseas tibiais, sem alteração na resistência óssea em ambos os ossos. Esses resultados demonstram que apesar do grupo HLU e OVX apresentassem alterações na densidade mineral óssea e microarquitetura óssea, podemos concluir que o desuso determinou maior perda no tecido cortical e na resistência óssea em relação à deficiência de estrógeno. Portanto, as análises da estrutura do tecido cortical, como a porosidade cortical, podem ser preponderantes para prever o risco de fratura.

Palavras-Chave: osteopenia, ratos, força óssea, ovariectomia, desuso.

PERES-UENO, MJ. Effects of disuse and estrogen deficiency on bone microarchitecture and its biomechanical properties. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Abstract

The objective of this study was to analyze whether there are differences in the effect of disuse and estrogen deficiency on trabecular and cortical bone tissue, and whether these effects influence the quality of bone tissue increasing its fragility. For this study, 30 Wistar rats with 19 weeks old, were divided into groups: control (CON), hindlimb unloading (HLU) and ovariectomy (OVX). In vivo analysis of bone density (DXA) from femurs and tibias and plasma levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, TRAP (spectrophotometry) and E₂ (ELISA) were performed at the beginning and end of the experiment, and 19 age 27 weeks, respectively. In the 27th week, the femur and tibia were disjointed and stored to assess the microstructure of trabecular and cortical bone (micro-computed tomography) and biomechanical properties of the femoral neck and femoral shaft and tibial (mechanical tests). The HLU group showed a decrease in plasma calcium concentration and total alkaline phosphatase activity, decreased femoral BMAD with increased cortical porosity and decrease in bone strength, however, there were no such changes in the tibia. The OVX group showed a decrease in plasma concentrations of calcium, decreased femoral BMAD, trabecular deterioration in the femur and tibia, with further deterioration in the tibial trabecular bone, with no change in bone strength in both bones. These results demonstrate that although the HLU and OVX group showed changes in bone mineral density and bone microarchitecture, we can conclude that the in disuse determined higher cortical tissue loss and bone strength relative to estrogen deficiency. Therefore, the analysis of the cortical tissue structure, such as cortical porosity can be prevalent to predict fracture risk.

Keywords: osteoporosis, rats, bone strength, ovariectomy, unloading.

Lista de Figuras

<i>Figura 1 -</i>	Diagrama esquemático do experimento animal.	22
<i>Figura 2 -</i>	Preparo e técnica de fixação do animal para a suspensão, utilizada para o descarregamento dos membros posteriores (HLU) (A). Animal na gaiola de suspensão com descarregamento dos membros posteriores (B).	24
<i>Figura 3 -</i>	Imagem do animal posicionado para a realização da análise densitométrica inicial e final (A) e captura da imagem do fêmur e da tíbia pelo densitômetro ósseo usando software especial para pequenos animais (B).	25
<i>Figura 4 -</i>	Densitômetro DPX-ALPHA LUNAR.	26
<i>Figura 5 -</i>	Região de interesse da imagem obtida na microtomografia óssea: (A) epífise proximal femoral (150 fatias abaixo da primeira imagem óssea), (B) Diáfise femoral (250 fatias abaixo da primeira imagem óssea), (C) Metáfise proximal tibial (100 fatias abaixo da faixa de crescimento) e (D) diáfise tibial (350 fatias abaixo da faixa de crescimento).	29
<i>Figura 6 -</i>	Ensaio mecânico de flexão de três pontos.	30
<i>Figura 7 -</i>	Ensaio mecânico de compressão no colo femoral.	30
<i>Figura 8 -</i>	Massa corporal (g) dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX), no início e no fim dos experimentos, com 19 e 27 semanas, respectivamente. * Diferença significativa entre o início e o fim do experimento, $p < 0,05$. ** Diferença significativa entre os grupos ao final do experimento, $p < 0,05$. Coluna apresenta média \pm desvio padrão.	32
<i>Figura 9 -</i>	Concentração plasmática de cálcio (A), fósforo (B), fosfatase alcalina total (C) e TRAP (D) de ratas do grupo controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX) no início e no fim dos experimentos, com 19 e 27 semanas, respectivamente. * Diferença significativa entre o início e o fim do experimento, $p < 0,05$. **	34
<i>Figura 10 -</i>	Reconstrução em 3D de 50 fatias da microtomografia do osso trabecular da epífise femoral (A) e da metáfise tibial (B) dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX).	35

Figura 11 - Reconstrução em 3D de 50 fatias da microtomografia do osso cortical da diáfise femoral (A) e da diáfise tibial (B) dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX).

37

Lista de Tabelas

- Tabela 1* - Densitometria óssea inicial (i) e final (f). Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g), área total (cm²) e Densidade Mineral Óssea areal (DMOa, g/cm²) de ratas CON, HLU e OVX. 33
- Tabela 2* - Microarquitetura do osso trabecular do fêmur e tíbia dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX). 36
- Tabela 3* - Microarquitetura do osso cortical do fêmur e tíbia dos grupos controle (COM), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX). 38
- Tabela 4* - Parâmetros biomecânicos da diáfise femoral e tibial e do colo femoral. 39

Lista de Abreviaturas

- BV/TV: volume ósseo sobre volume total (fração do volume ósseo)
- cm²: centímetro quadrado
- CMO: conteúdo mineral ósseo
- CON: controle
- Conn.Dn: conectividade da densidade
- Ct.BA: área do tecido cortical
- Ct.MA: área medular
- Ct.PO: porosidade cortical
- Ct.Th: espessura cortical
- Ct.TV: área do volume tecidual total
- DMO: densidade mineral óssea
- DMOa: densidade mineral óssea areal
- DP: desvio padrão
- DXA: densitômetro de dupla emissão de raios-X
- E₂: Estradiol
- FAL: fosfatase alcalina
- g/cm²: grama por centímetro quadrado
- g: grama
- HLU: hindlimb unloading - descarregamento dos membros posteriores
- i.m: intra muscular
- IL -1: interleucina 1

- Kg: quilograma
- M: média
- mg/dL: miligrama por decilitro
- mg: miligrama
- mJ: milijoule
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- N/mm: Newton por milímetro
- N: Newton
- OPG: osteoprotegerina
- OVX: ovariectomia
- Po.Dm: diâmetro do poro
- Po.N: número de poros
- Po.Sp: espaço entre os poros
- Po.Total: porosidade total
- RANK: receptor ativador do fator nuclear-Kb
- RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB
- SMI: índice do modelo de estrutura
- Tb.N: número trabecular
- Tb.Sp: separação da trabécula
- Tb.Th: espessura trabecular
- TNF α : fator de necrose tumoral alfa
- TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
- U/L: unidade por litro

Sumário

1	Introdução	17
2	Objetivos	21
3	Metodologia	22
3.1	Animais e procedimento experimental	22
3.2	Ciclo Estral	23
3.3	Ovariectomia	23
3.4	Descarregamento dos membros posteriores	24
3.5	Massa corporal	25
3.6	Densidade óssea <i>in vivo</i>	25
3.7	Análises Bioquímicas	26
3.7.1	Cálcio	26
3.7.2	Fósforo	26
3.7.3	Fosfatase Alcalina Total	27
3.7.4	TRAP	27
3.7.5	Estradiol	27
3.8	Microtomografia Computadorizada	27
3.9	Ensaio Mecânico	29
3.9.1	Flexão de três pontos do fêmur e da tíbia	30
3.9.2	Colo Femoral	30
3.10	Análise estatística	31
4	Resultados	31
5	Discussão	39
6	Conclusões	47
	Referências	48
	Anexo	54

1 Introdução

O tecido ósseo é um órgão rígido e dinâmico, caracterizado como tipo de tecido conectivo, composto por elementos orgânicos e inorgânicos (1). A fim de manter sua integridade estrutural e desempenhar sua função na homeostase mineral, o osso é continuamente moldado e reparado, processo chamado de remodelação óssea, que é caracterizada por comunicação de células ósseas incluindo osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (2).

Os osteoclastos, células multinucleadas, são responsáveis pela reabsorção óssea (3), já os osteoblastos tem habilidade em produzir tecido mineralizado, depositam novo osso para preencher o túnel escavado pelos osteoclastos (4), além disso, se diferenciam em osteócitos, que se incorporam na matriz extracelular e atuam como mecanorreceptores no tecido ósseo (5).

A comunicação entre as células é fundamental para que a remodelação óssea aconteça, sendo esta regulada por fatores locais, citocinas, hormônios e forças mecânicas (6).

Dentre os fatores que regulam o metabolismo ósseo, está o sistema RANK/RANKL/OPG (3). O receptor ativador do fator nuclear-kB (RANK) localiza-se na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros, e sua ligação com o ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB (RANKL) causa a inibição da apoptose dos osteoclastos, além de estimular a diferenciação e ativação dos osteoclastos, o que causará reabsorção. A ativação de RANK pode ser antagonizada pela presença da osteoprotegerina (OPG), que sequestrará RANKL, inibindo a diferenciação e ativação osteoclástica (6, 7).

Portanto, as células ósseas podem controlar a osteoclastogênese em direção positiva por meio do aumento da expressão de RANKL e diminuição da expressão de OPG ou, inversamente, diminuindo a atividade da reabsorção óssea se as proporções forem invertidas (4).

Dentre os hormônios, o estrógeno exerce atuação importante na remodelação óssea, mantendo o balanço entre formação e reabsorção (8).

O estrógeno estimula a expressão de OPG (9) e inibe a ativação de

RANKL (10), além de atuar sobre os monócitos promovendo redução plasmática de Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF- α) (11, 12), substâncias que regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos.

A deficiência de estrógeno, como na mulher menopausada, leva ao desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, onde o aumento da reabsorção óssea excede a de formação (13). Esse desequilíbrio contribui para a perda da qualidade óssea (14), aumentando a incidência de osteoporose (15), patologia que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo.

A carga mecânica também tem consequências profundas na remodelação óssea, pois o desuso provoca aceleração na remodelação óssea, causando rápida perda de massa óssea (4).

O osso tem habilidade em se adaptar ao estresse mecânico mudando seu tamanho e formato, assegurando o desempenho mecânico do esqueleto humano (16). Essa adaptação mecânica no tecido ósseo é provocada por ações dos osteoclastos e osteoblastos, os quais são orquestrados pelas células mecanossensoriais, os osteócitos (17).

Quando o estímulo mecânico externo produz deformação no tecido ósseo, ocorre tensão de cisalhamento, que atua sobre a membrana plasmática dos osteócitos e são transmitidas por toda célula resultando na liberação de mediadores bioquímicos para a regulação da atividade osteoclástica ou osteoblástica (5). Portanto, o desuso ou o excesso do uso produz fluxo canalicular anormal, o qual é traduzido em sinais de reabsorção ou formação óssea.

A imobilização ou o desuso está associado com aumento da esclerostina, produzida pelos osteócitos. A proteína esclerostina é inibidor potente da formação óssea, agindo sobre a sinalização Wnt que regula a diferenciação osteoblástica (18, 19). Portanto, a supressão mecânica gerada pela diminuição ou perda da atividade física, como em pacientes acamados, imobilizados ou em astronautas, desencadeia redução na resistência e na massa óssea (20-23), devido ao declínio do número de osteoblastos, determinando diminuição na formação óssea (24) que também acarretará no

aumento na incidência da osteoporose.

A osteoporose é caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura óssea o qual resulta na diminuição na densidade mineral óssea (DMO), seguida pela diminuição da resistência óssea com maior suscetibilidade às fraturas (1, 25, 26).

A fratura óssea está associada, em humanos, com elevados gastos públicos, redução de sua expectativa de vida, bem como perda de independência (27-29). Portanto, para identificar o risco de fratura é necessário e emergente analisar quais fatores são preponderantes na qualidade óssea (30).

Sabe-se que o carregamento mecânico e a concentração plasmática de estrógeno exerce função crucial para a manutenção da estrutura e remodelamento ósseo. Para compreender melhor esses mecanismos, modelos de animais são rotineiramente usados para avaliar a qualidade óssea devido às limitações encontradas em estudos com participantes humanos. A ausência de carga nos membros posteriores (HLU - hindlimb unloading) é método usado para simular os efeitos do desuso e hipoatividade física sobre o sistema esquelético (26, 31, 32). Já a ovariectomia (OVX) induz a deficiência de estrógeno semelhantemente em mulheres após a menopausa(33).

Contudo, ainda não há consenso se diferentes alterações, sejam essas mecânicas ou hormonais, exercem os mesmos efeitos sobre a microestrutura óssea e suas propriedades mecânicas.

Poucos estudos compararam estes métodos de indução à osteopenia, e quando realizados, além de estudar apenas um sítio esquelético, se limitaram na avaliação da DMO ou na avaliação trabecular, sem avaliar a microestrutura cortical e sua importância para a predição das fraturas tanto no fêmur quanto na tíbia.

Sabe-se que a osteoporose é diagnosticada geralmente por meio da medição da DMO pelo densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA) (34-36) e que baixo DMO está associado com aumento do risco de fratura (37). Entretanto, a resistência do osso também é determinada por fatores como a sua geometria e qualidade (38).

A hipótese deste trabalho é que, apesar de ambos os métodos desencadearem diminuição na DMO, o desuso determinará maior perda na resistência óssea em relação à deficiência de estrógeno.

2 Objetivos

Objetivo Geral:

Analisar se há diferenças no efeito do desuso e da deficiência de estrógeno sobre o tecido ósseo trabecular e cortical, e se estes efeitos influenciam na qualidade do tecido ósseo aumentando sua fragilidade. Com este estudo pretende-se contribuir com informações que visem à prevenção de osteopenia e melhor qualidade de vida para organismos femininos na fase adulta.

Objetivos Específicos:

Avaliar a influência do desuso e da deficiência de estrógeno sobre:

- ❖ A densidade mineral óssea areal;
- ❖ As concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina total e TRAP como indicadores de predisposição à reabsorção ou formação de tecido ósseo;
- ❖ A qualidade do tecido ósseo trabecular e cortical pela análise da microtomografia óssea;
- ❖ A fragilidade óssea analisando os parâmetros biomecânicos como a força máxima, rigidez e energia no colo do fêmur e nas diáfises femorais e tibiais por meio do ensaio mecânico.

3 Metodologia

Todos os procedimentos utilizados para realização deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil (CEUA: FOA - 01037- 2013) (ANEXO).

3.1 Animais e procedimento experimental

Foram utilizadas 30 ratas Wistar (Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba/SP) mantidas em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), em gaiolas comuns com número de cinco animais cada, alimentadas com ração para ratos de mesma qualidade e fabricante (Purina®-Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil/12-13g/kg cálcio) e água a vontade. A saúde geral das ratas foi monitorizada diariamente e o esfregaço vaginal foi analisado durante a 17ª e 18ª semana de vida das ratas, para comprovação do ciclo estral regular de acordo com o protocolo de Long e Evans (39). Ao completarem 19 semanas de idade, período em que não há influência do rápido crescimento ósseo (≤ 3 meses de idade) ou perda óssea pela idade (≥ 9 meses de idade) (40), os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (CON); grupo descarregamento dos membros posteriores (HLU) e grupo ovariectomizado (OVX) como mostrado no diagrama esquemático na figura 1.

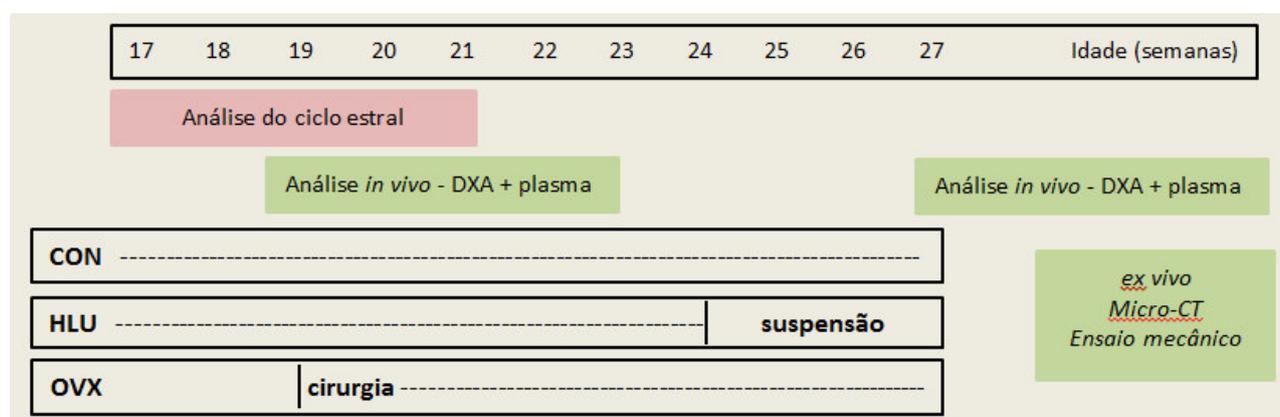


Figura 1 – Diagrama esquemático do experimento animal.

3.2 Ciclo estral

O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro dias, caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pela distribuição dos tipos celulares observados no esfregaço vaginal, entre eles, os leucócitos, células arredondadas nucleadas e células epiteliais cornificadas. O acompanhamento e análise do ciclo estral das ratas foram realizados durante 15 dias na 17^a e 18^a semana de vida. Os animais que apresentaram ciclicidade foram aleatoriamente distribuídos nos grupos experimentais. O acompanhamento do ciclo estral de todos os animais foi realizado por meio do esfregaço vaginal não corado colhido no período matutino (8h) e analisado a fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de Long e Evans (39).

3.3 Ovariectomia

Após análise do ciclo estral, com 19 semanas de idade, as ratas do grupo OVX foram ovariectomizadas (41). Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetaset – Fort Dodge/ 50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.), para a realização de incisões abdominais laterais, na região pré-pubiana, acessando-se e expondo as porções distais do útero. Logo após, foi realizada a remoção dos ovários nos animais do grupo ovariectomizado. Em seguida, todos os animais foram suturados e receberam dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, 1 mL/kg, i.m; Fort Dodge Animal Health Ltd) e anti-inflamatório (Meloxicam, 1mg/kg, subcutâneo). Para comprovar a deficiência de estrógeno, foi realizado o acompanhamento e análise do ciclo estral 15 dias após a ovariectomia. A eutanásia de todos os grupos foi realizada dois meses após a ovariectomia com 27 semanas.

3.4 Descarregamento dos membros posteriores

O grupo HLU foi submetido ao descarregamento dos membros posteriores durante 21 dias antes do fim do experimento, proposto por Morey-Holton e Globus (42), com modificações no protocolo, utilizando espuma adesiva (Reston), que foi colocada de um lado a outro na cauda e fixada com esparadrapo (Figura 2A). O animal não precisa ser anestesiado. Após tal procedimento a alça de espuma foi presa a uma presilha e dependurado em uma barra cilíndrica rosqueada com altura ajustável no compartimento superior da gaiola (Figura 2A). Deste modo, é permitido ao animal apoio suficiente dos membros anteriores para locomover-se e alimentar-se (Figura 2B). Na barra de sustentação foram colocados dois bloqueios metálicos nas extremidades, que foram ajustados de modo a não permitir que o animal tenha contato com as paredes da gaiola. A água foi fornecida por bebedouro colocado em altura adequada na parede da gaiola e ração comum foi colocada no assoalho. Os animais foram suspensos durante 21 dias e a eutanásia foi realizada logo em seguida, com 27 semanas de idade.

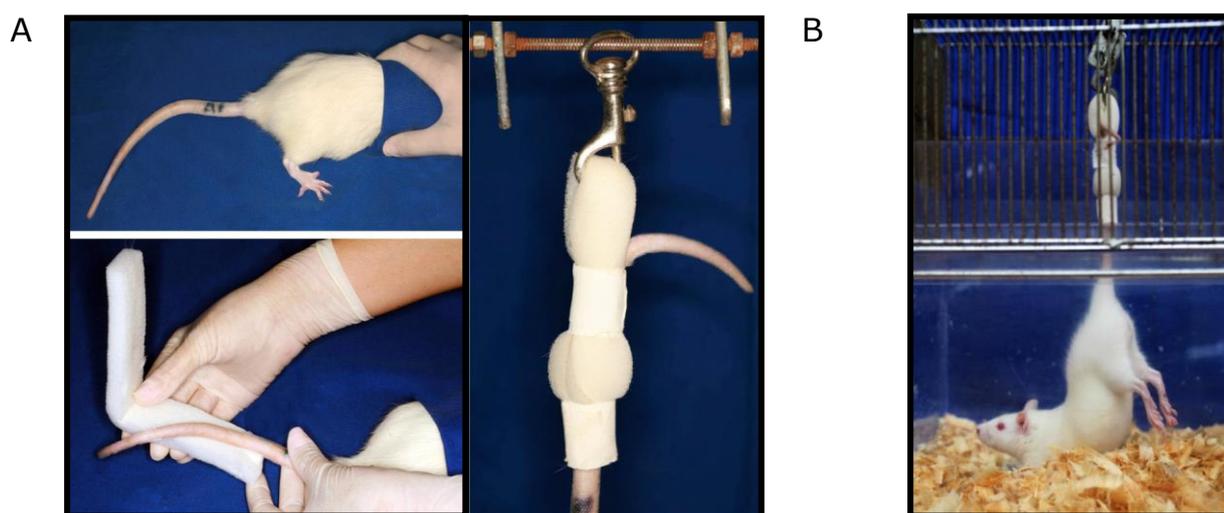


Figura 2: Preparo e técnica de fixação do animal para a suspensão, utilizada para o descarregamento dos membros posteriores (HLU) (A). Animal na gaiola de suspensão com descarregamento dos membros posteriores (B). Fonte: VALADARES, A. 2012.

3.5 Massa Corporal

A massa corporal de todos os animais foi mensurada no início e no fim do experimento, com 19 e 27 semanas de idade, utilizando balança digital de precisão Toledo^o.

3.6 Densidade mineral óssea *in vivo*

Ao completar 19 e 27 semanas de idade (antes e após os experimentos, respectivamente), os animais de todos os grupos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetaset – Fort Dodge/ 50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.), para a realização da densitometria óssea *in vivo* dos fêmures e tíbias do lado direito. Após a anestesia, os animais foram colocados individualmente sobre o densitômetro (Figura 3A) na posição de incidência póstero-anterior (PA) e submetidos à análise da densidade mineral óssea areal – DMOa (em g/cm²), área (cm²) e conteúdo mineral ósseo – CMO (g) medidos em todo o osso. A DMOa foi medida com o densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA) (Figura 4) previamente calibrado conforme fabricante (modelo DPX-Alpha, Lunar[®] WI, USA) com software especial para pequenos animais acoplado a um computador (Figura 3B).

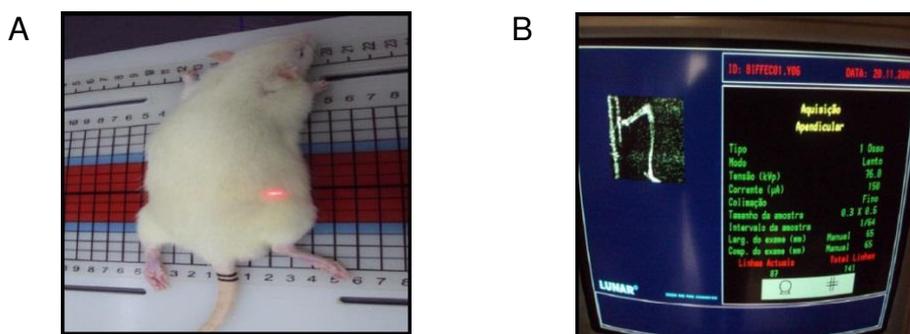


Figura 3: Imagem do animal posicionado para a realização da análise densitométrica inicial e final (A) e captura da imagem do fêmur e da tíbia pelo densitômetro ósseo usando software especial para pequenos animais (B). Fonte: BIFFE, BG. 2011.



Figura 4: Densitômetro DPX-ALPHA LUNAR. Fonte: STRINGHETTA-GARCIA, CT, 2012.

3.7 Análises Bioquímicas

A coleta sanguínea foi realizada no início do experimento com 19 semanas de idade, e ao final do experimento com 27 semanas por meio de punção cardíaca (43). O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. O plasma foi fracionado e armazenado em freezer -80°C. Foram realizadas análises bioquímicas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina total e TRAP para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo e análise da concentração de estradiol para comprovação do hipoestrogenismo.

3.7.1 Cálcio

As determinações de cálcio foram realizadas por método espectrofotométrico (Calcium Liquiform, Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil, cat. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm.

3.7.2 Fósforo

As determinações de fósforo foram realizadas pelo método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972) (44) modificado, utilizando kits comerciais (Phosphorus UVLiquiform, Labtest Diagnostica SA, MG, Brasil, Cat. 12). O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de complexo fosfomolibdato não reduzido, que foi determinado em 340 nm.

3.7.3 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina foi usado como marcador de formação óssea, e determinada por método de ROY (45) (1970) modificado, com o emprego de Kits comerciais (Fosfatase Alcalina, Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil, Cat. 40), por reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato.

3.7.4 TRAP

A atividade da TRAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o protocolo adaptado de Granjeiro et al. (1997) (46) e Janckila et al. (2006) (47) usado como marcador da atividade osteoclástica.

3.7.5 Estradiol (E₂)

A determinação da concentração plasmática de E₂ (IBL international GMBH, Hamburgo, Alemanha) foi realizada por meio de ensaio de imunabsorbância ligado a enzima (ELISA) por fase sólida, sendo a dose mínima detectável de 0,28 pg/mL. Todas as amostras foram dosadas em monoclonata e no mesmo ensaio para evitar erro inter-ensaio.

3.8 Microtomografia computadorizada

Após a eutanásia, os fêmures e as tíbias do lado direito de cinco animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e imediatamente armazenados com soro fisiológico a -20°C. Vinte quatro horas antes das análises, os ossos foram transferidos para uma temperatura de 7°C e depois mantidos em temperatura ambiente até o término da microtomografia óssea.

Foi realizada avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea dos fêmures e tíbias, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) da UNICAMP com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1174 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). Todas as peças foram conduzidas com filtro de alumínio

0.5mm, 185° de rotação, 0.4° de passo, 50kV e 800 μ A de configuração da fonte. Os fêmures e as tíbias foram posicionados craniocaudalmente para a obtenção das fatias, com resolução de 16 μ m e 14 μ m, respectivamente. A região de interesse de osso trabecular da epífise femoral foi manualmente interpolada e analisada 50 fatias, na região que compreende cabeça, colo e trocânter maior do fêmur, 150 fatias abaixo da primeira imagem óssea. A região de interesse de osso trabecular da tíbia foi manualmente interpolada e foram analisadas 50 fatias na metáfise proximal da tíbia, 100 fatias abaixo da faixa de crescimento. No osso cortical do fêmur, na diáfise femoral, foram analisadas 50 fatias, 250 fatias abaixo da primeira imagem óssea. A região de interesse do osso cortical da tíbia foi manualmente interpolada e analisadas 50 fatias na diáfise tibial, 350 fatias abaixo da faixa de crescimento. A figura 5 apresenta as regiões analisadas na microtomografia óssea.

Cada peça foi reconstruída usando o software que acompanha o Skyscan (NRECON;Skyscan) e para a análise tridimensional (3D) foi utilizada o software CTAn v.1.5.0 (Skyscan). Os parâmetros analisados para o osso trabecular foram: BV/TV (%) - volume ósseo percentual (volume ósseo pelo volume tecidual); Tb.Th (mm) - espessura trabecular; Tb.N (mm^{-1}) - número de trabéculas por milímetro de tecido, Tb.Sp (mm) - separação trabecular, SMI - índice do modelo de estrutura, Po total (%) - porosidade total e Conn.Dn (mm^{-3}) - densidade da conectividade. Para o osso cortical na diáfise do fêmur e tíbia, as características e métodos foram descritas por Bonnet (48). Foram analisados Ct.TV (mm^2) - área do volume total, Ct.BA (mm^2) - área óssea, Ct.MA (mm^2) - área medular, Ct.Po (%) - porosidade cortical e Po.N (1/mm) - número de poros, mensurados de acordo com o método MIL, Po.Dm (mm) - diâmetro do poro e Po.Sp (mm) - espaçamento do poro foram derivados a partir do método de Hildebrand (49). A espessura cortical Ct.Th (mm) foi analisado com o programa Image J (Domínio Público), usando os slices reconstruídos a partir da microtomografia óssea (50).

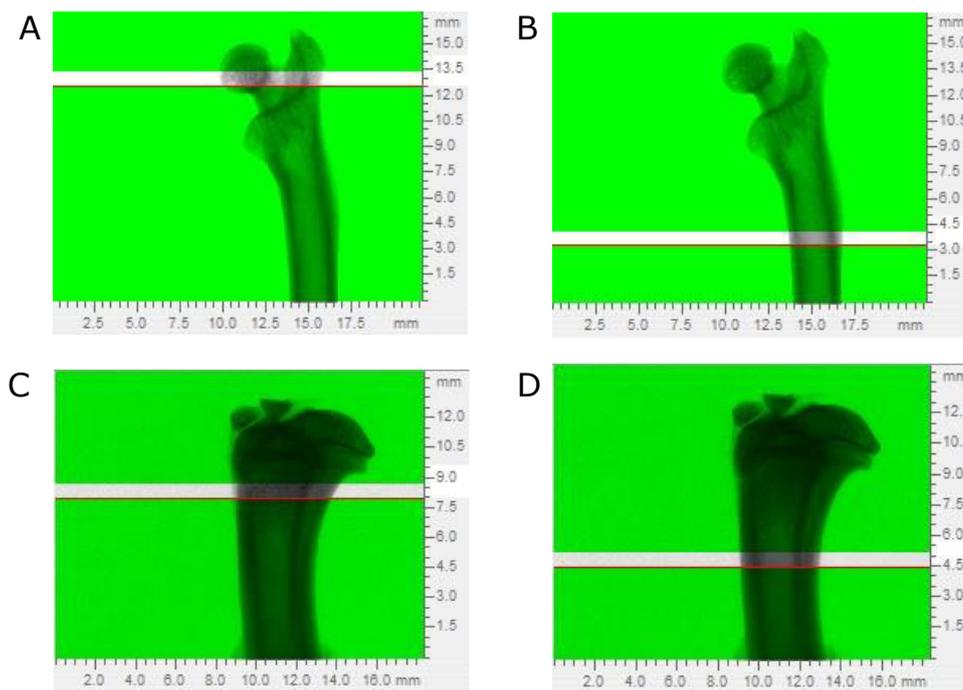


Figura 5- Região de interesse da imagem obtida na microtomografia óssea: (A) epífise proximal femoral (150 fatias abaixo da primeira imagem óssea), (B) Diáfise femoral (250 fatias abaixo da primeira imagem óssea), (C) Metáfise proximal tibial (100 fatias abaixo da faixa de crescimento) e (D) diáfise tibial (350 fatias abaixo da faixa de crescimento). Fonte: PERES-UENO, MJ. 2015.

3.9 Ensaio mecânico

Os fêmures e tíbias do lado direito de todos os animais foram submetidos a ensaios mecânicos em máquina universal EMIC®, modelo DL 3000. A carga foi aplicada com velocidade de 2 mm/min e aplicação da força de 2000N para determinação da força máxima (N) e determinação posterior da rigidez óssea (N/mm) e energia absorvida até a força máxima (mJ) calculados a partir da curva obtida no ensaio (51). Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento que fornece os valores de Força x Deformação. Para o cálculo da Rigidez determinou-se a parte da curva de Força x Deformação relativa à fase elástica do ensaio. A energia absorvida pelo osso é obtida pela área sob a curva força x deformação até o ponto de força máxima.

3.9.1 *Flexão de três pontos do fêmur e da tibia*

As tíbias e os fêmures foram apoiados em dois suportes (dois pontos) sendo a distância de vão de apoio de 20 mm (Figura 6). A força foi aplicada nos ossos em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (ensaio de flexão em três pontos) (51).



Figura 6: Ensaio mecânico de flexão de três pontos. Fonte: PERES-UENO, MJ. 2015.

3.9.2 *Colo femoral*

Para análise da força máxima, rigidez e energia na região do colo femoral, o fêmur foi colocado em aparato metálico adaptado e mantido fixado na vertical - longo eixo (Figura 7). A força de compressão foi aplicada na região da cabeça do fêmur cuja linha de ação do vetor força é paralela ao eixo longo do fêmur, causando momento fletor na região da cabeça e colo femoral (52).



Figura 7: Ensaio mecânico de compressão no colo femoral. Fonte: PERES-UENO, MJ. 2015.

3.10 Análise Estatística

Os dados foram representados como média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi analisada com o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram submetidos à análise de variância - ANOVA e seguido pelo pós-teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn's (não paramétrico) para comparação entre os grupos ao final do experimento. Para análise intra-grupo, no início e fim do tempo experimental, os dados foram submetidos ao teste t pareado. Foi utilizado o programa computacional GraphPad InStat®, versão 6.0. O nível de significância adotado foi de 5% em todas as análises.

4 Resultados

Após a realização do ciclo estral, quatro animais apresentaram aciclicidade e foram excluídos do experimento, dois animais do grupo CON e dois do grupo HLU. Com 19 semanas, ao realizar o DXA, um animal do grupo CON morreu após a anestesia.

4.1 Massa Corporal

Após o fim do experimento, com 27 semanas de idade, a massa corporal aumentou significativamente comparada ao início do experimento nos grupos CON ($270,4 \pm 22,27\text{g}$ x $293,5 \pm 24,44\text{g}$, $p = 0,0003$) e OVX ($292,8 \pm 25,74\text{g}$ X $352,8 \pm 29,61\text{g}$, $p = 0,0010$), e diminuiu no grupo HLU ($286,1 \pm 15,65\text{g}$ X $275,5 \pm 24,97\text{g}$, $p = 0,0163$). Entre os grupos, ao final do experimento, a massa corporal do grupo OVX foi significativamente maior que a do grupo CON ($p = 0,0003$) e que a do grupo HLU ($p = 0,0001$) (Figura 8).

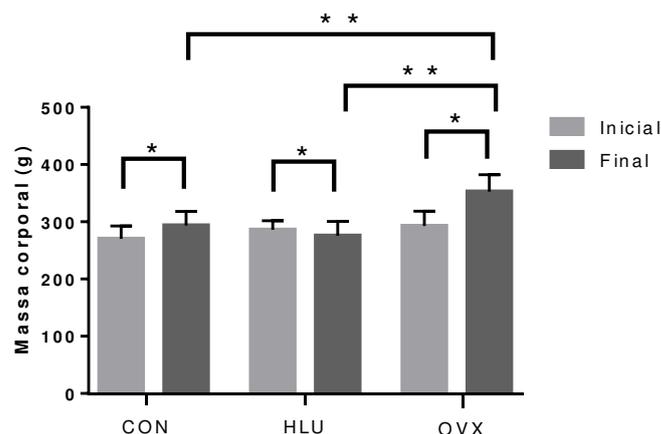


Figura 8 - Massa corporal (g) dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX), no início e no fim dos experimentos, com 19 e 27 semanas, respectivamente. * Diferença significativa entre o início e o fim do experimento, $p < 0,05$. ** Diferença significativa entre os grupos ao final do experimento, $p < 0,05$. Coluna apresenta média \pm desvio padrão.

4.2 Densidade óssea *in vivo*

A análise da densitometria óssea inicial (19 semanas) e final (27 semanas) dos animais está apresentada na Tabela 1. Houve diminuição na DMOa dos fêmures do grupo HLU e OVX quando comparado ao início do experimento ($p = 0,015$ e $p = 0,007$, respectivamente). Porém, ao analisar a DMOa final entre os grupos, não observou diferença significativa ($p = 0,105$, ANOVA).

O CMO dos fêmures não apresentou diferença tanto entre início e fim de cada grupo, quanto entre os grupos. A área total dos fêmures do grupo HLU e OVX foi maior comparado ao início do experimento ($p = 0,039$ e $p = 0,009$, respectivamente).

Ao analisar as tíbias, a DMOa dos grupos CON, HLU e OVX não apresentou diminuição significativa. O CMO das tíbias do grupo OVX foi maior comparado ao HLU ao final do experimento ($p = 0,0196$). Houve aumento na área da tíbia do grupo CON ($p = 0,0391$) e no OVX ($p = 0,0098$) comparado ao início do experimento.

Tabela 1 - Densitometria óssea inicial (i) e final (f). Conteúdo Mineral Ósseo (CMO, g), área total (cm²) e Densidade Mineral Óssea areal (DMOa, g/cm²) de ratas CON, HLU e OVX.

	CON		HLU		OVX	
	i	f	i	f	i	f
N	10	7	10	8	10	10
<i>Fêmur</i>						
DMOa (g/cm ²)	0,253 ± 0,04	0,248 ± 0,04	0,271 ± 0,07 ^a	0,220 ± 0,02 ^b	0,250 ± 0,03 ^a	0,228 ± 0,01 ^b
CMO (g)	0,256 ± 0,05	0,262 ± 0,05	0,270 ± 0,08	0,235 ± 0,03	0,256 ± 0,05	0,266 ± 0,02
Área (cm ²)	1,010 ± 0,10	1,053 ± 0,10	1,013 ± 0,09 ^a	1,072 ± 0,10 ^b	1,018 ± 0,10 ^a	1,124 ± 0,10 ^b
<i>Tíbia</i>						
DMOa (g/cm ²)	0,186 ± 0,02	0,174 ± 0,03	0,203 ± 0,06	0,160 ± 0,01	0,191 ± 0,17	0,164 ± 0,02
CMO (g)	0,227 ± 0,06	0,201 ± 0,04	0,246 ± 0,07	0,178 ± 0,01 ^A	0,207 ± 0,04	0,223 ± 0,03 ^B
Área (cm ²)	1,130 ± 0,12 ^a	1,160 ± 0,13 ^{bA}	1,173 ± 0,102	1,112 ± 0,05 ^A	1,134 ± 0,10 ^a	1,298 ± 0,06 ^{bB}

Valores em média ± desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes significam diferenças significantes entre o início e o fim do experimento no mesmo grupo com $p < 0,05$ realizados com teste t pareado paramétrico ou não paramétrico. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significantes entre os grupos ao final do experimento com $p < 0,05$ realizados com o teste ANOVA seguido por teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn's (não-paramétrico). CON: grupo controle; HLU: grupo descarregamento dos membros posteriores; OVX: grupo ovariectomizado; DMOa: densidade mineral óssea, CMO: conteúdo mineral ósseo.

4.3 Dosagens bioquímicas

Os ensaios bioquímicos evidenciaram que a concentração plasmática de E₂ após a ovariectomia, diminuiu 75% comparado ao controle, enquanto que no grupo HLU a diminuição foi apenas 16%. A concentração plasmática de cálcio foi menor após os experimentos nos grupos HLU ($11,29 \pm 0,79 \times 9,94 \pm 1,49$ mg/dL, $p = 0,0320$) e OVX ($11,40 \pm 0,62 \times 10,15 \pm 1,65$ mg/dL, $p = 0,0318$) comparados ao início do experimento (Figura 9A). As concentrações de fósforo de todos os grupos experimentais mantiveram a concentração em equilíbrio (Figura 9B). A atividade da fosfatase alcalina nas ratas HLU foi significativamente menor comparado ao início do experimento ($54,18 \pm 11,82 \times 38,99 \pm 5,33$ U/L, $p = 0,0313$) e menor comparado ao grupo OVX ($p = 0,0282$)

(Figura 9C). A atividade da TRAP no grupo CON diminuiu significativamente comparada ao início do experimento ($p = 0,001$) representando queda de 40% (Figura 9D). Embora não haja diferença estatisticamente significativa entre os grupos HLU e OVX ao final do experimento, nota-se que no grupo HLU houve diminuição de 20% na atividade de TRAP enquanto que no grupo OVX essa diminuição foi atenuada, com apenas 11% comparado ao início do experimento, sinalizando aumento da atividade osteoclástica comparado ao grupo controle.

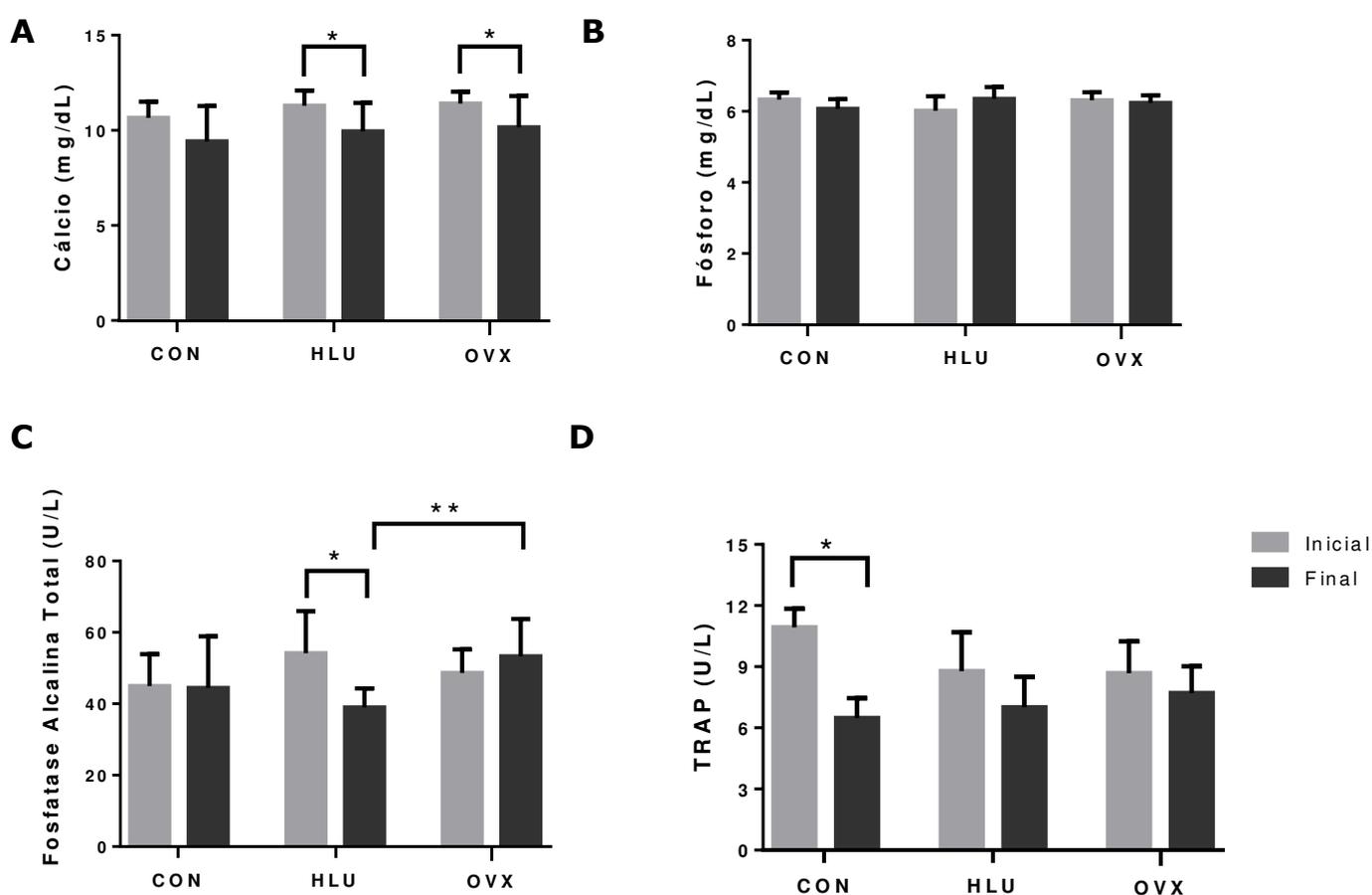


Figura 9- Concentração plasmática de cálcio (A), fósforo (B), fosfatase alcalina total (C) e TRAP (D) de ratas do grupo controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX) no início e no fim dos experimentos, com 19 e 27 semanas, respectivamente. * Diferença significativa entre o início e o fim do experimento, $p < 0,05$. ** Diferença significativa entre os grupos ao final do experimento, $p < 0,05$. Coluna representa média \pm desvio padrão.

4.4 Microtomografia óssea do osso trabecular

Após a OVX, houve deterioração na microestrutura óssea trabecular na epífise proximal femoral, com diminuição em BV/TV ($p = 0,034$) e aumento na Po.total ($p = 0,048$) comparado ao CON (Tabela 2; figura 10A). Em contra partida, não houve diferença significativa entre HLU e CON na microestrutura femoral.

Na tíbia, a alteração óssea após a OVX foi exacerbada com alteração em BV/TV, Tb.N, Conn.Dn, SMI e PO.total (todos $p < 0,05$) comparado ao grupo CON, e aumento no espessamento trabecular- Tb.Sp comparado ao grupo HLU ($p = 0,042$) (Tabela 2; figura 10B).

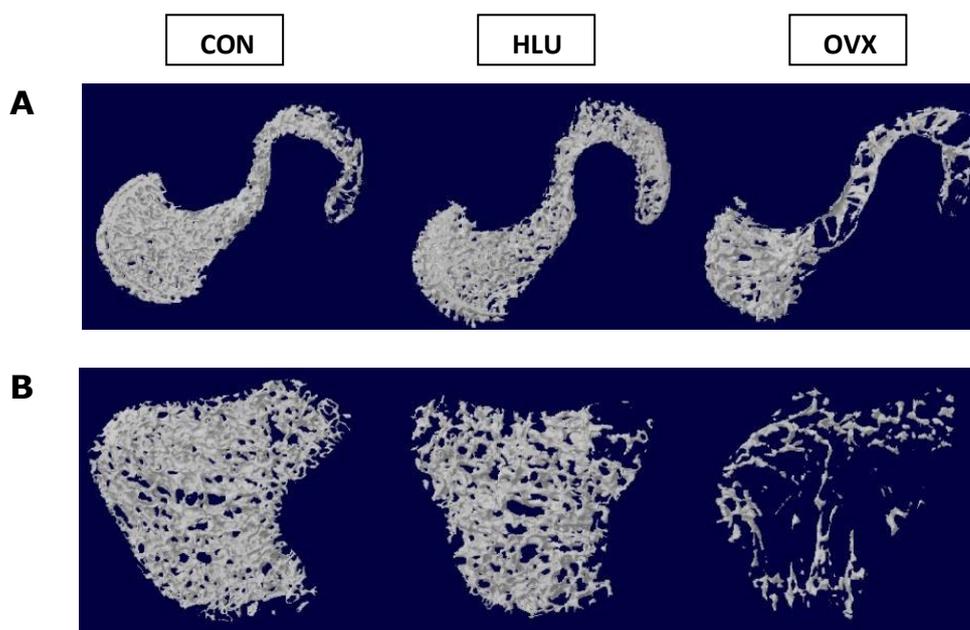


Figura 10 - Reconstrução em 3D de 50 fatias da microtomografia do osso trabecular da epífise femoral (A) e da metáfise tibial (B) dos grupos controle (CON), suspenso (HLU) e ovariectomizado (OVX).

4.5 Microtomografia óssea do osso cortical

A área do volume total (Ct.TV) foi maior nos grupos HLU e OVX comparado ao CON ($p=0,006$, ANOVA), porém, a área medular (Ct.MA) também aumentou significativamente em ambos os grupos ($p = 0,006$, ANOVA). O espaçamento do poro (Po.Sp) foi maior nos grupos HLU e OVX ($p =$

0,0001 ANOVA). O efeito do desuso mostrou alteração na microestrutura óssea cortical na diáfise do fêmur diferindo dos resultados que obteve no osso trabecular na epífise femoral, causando aumento na porosidade cortical (Ct.Po) comparado ao CON ($p = 0,020$) (Tabela 3; figura 11A).

Na diáfise tibial houve aumento em Ct.TV e Ct.MA no grupo OVX comparado ao grupo HLU ($p = 0,0137$ e $p = 0,0194$, respectivamente). Os demais parâmetros não tiveram diferenças significantes (Tabela 3; figura 11B).

Tabela 2 - Microarquitetura do osso trabecular do fêmur e tibia dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX).

	CON	HLU	OVX	<i>p value</i>
<i>Epífise femoral</i>				
BV/TV (%)	62,53 ± 3,13 ^A	58,73 ± 8,42 ^{AB}	44,00 ± 18,21 ^B	0,049
Tb.N (mm ⁻¹)	3,73 ± 0,26	3,61 ± 0,00	3,01 ± 1,53	1,000
Tb.Th (mm)	0,15 ± 0,00 ^A	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,13 ± 0,005 ^B	0,048
Tb.Sp (mm)	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,29 ± 0,22	0,223
Conn.Dn (mm ⁻³)	73,89 ± 4,20	90,94 ± 20,31	77,39 ± 35,17	0,241
SMI	-0,18 ± 0,28	0,17 ± 0,80	0,61 ± 0,58	0,075
Po total (%)	37,44 ± 3,096 ^A	41,26 ± 8,41 ^{AB}	55,99 ± 18,21 ^B	0,049
<i>Metáfise tibial</i>				
BV/TV (%)	37,46 ± 11,97 ^A	36,37 ± 10,27 ^{AB}	13,02 ± 6,52 ^B	0,013
Tb.N (mm ⁻¹)	3,019 ± 0,68 ^A	3,019 ± 0,6801 ^A	0,994 ± 0,505 ^B	0,013
Tb.Th (mm)	0,11 ± 11,97	0,10 ± 0,009	0,10 ± 0,009	0,511
Tb.Sp (mm)	0,20 ± 0,05 ^{AB}	0,19 ± 0,04 ^A	0,450 ± 0,12 ^B	0,013
Conn.Dn (mm ⁻³)	103,1 ± 37,75 ^{AB}	106,6 ± 26,40 ^A	25,99 ± 14,45 ^B	0,013
SMI	1,41 ± 0,56 ^A	1,47 ± 0,48 ^A	2,38 ± 0,18 ^B	0,003
Po total (%)	62,53 ± 11,97 ^A	63,62 ± 10,27 ^{AB}	86,97 ± 6,52 ^B	0,013

Valores em média ± desvio padrão, n = 5 ossos/grupo. Avaliados por microtomografia óssea. Letras diferentes significam diferenças significantes com $p < 0,05$ realizados com o teste ANOVA seguido por teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn's (não-paramétrico). BV/TV: fração do volume ósseo; Tb.N: número trabecular; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação da trabécula; Conn.Dn: densidade da conectividade; SMI: índice do modelo de estrutura; Po total: porosidade total.

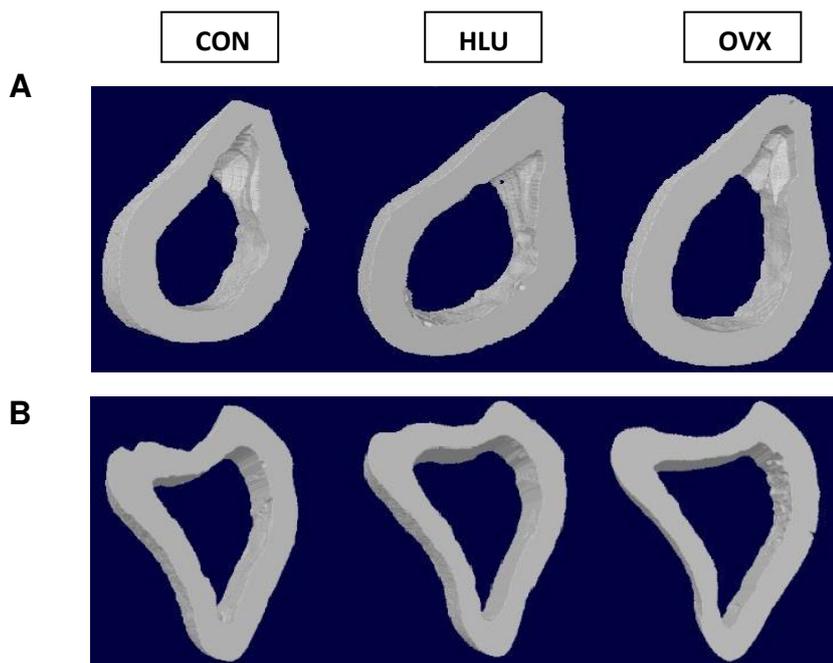


Figura 11 - Reconstrução em 3D de 50 fatias da microtomografia do osso cortical da diáfise femoral (A) e da diáfise tibial (B) dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX).

4.6 Ensaio de flexão de três pontos

Na diáfise femoral, a força máxima do grupo HLU foi menor comparado ao OVX ($p = 0,036$), porém sem diferença estatística entre CON ($p = 0,791$) (Tabela 4). A energia absorvida até a força máxima foi maior no OVX ($p = 0,001$, ANOVA), mostrando que na diáfise femoral, o grupo OVX suportou maior carga comparado ao grupo HLU. Entretanto, na diáfise tibial, os parâmetros biomecânicos analisados não obtiveram diferenças estatísticas entre os grupos.

4.7 Colo femoral

No colo do fêmur, o grupo HLU demonstrou maior rigidez comparado ao OVX ($p = 0,014$), porém sem diferença estatística entre CON ($p = 0,247$) (Tabela 4). A energia absorvida até a força máxima foi maior no grupo OVX (p

= 0,016, ANOVA), mostrando que no colo femoral, o grupo OVX suportou maior carga comparado ao grupo HLU.

Tabela 3 - Microarquitetura do osso cortical do fêmur e tíbia dos grupos controle (CON), descarregamento dos membros posteriores (HLU) e ovariectomizado (OVX).

	CON	HLU	OVX	<i>p value</i>
<i>Diáfise femoral</i>				
Ct.TV (mm ²)	35,2 ± 3,42 ^A	44,45 ± 3,23 ^B	43,98 ± 5,32 ^B	0,006
Ct.BA (mm ²)	26,52 ± 1,97	29,74 ± 2,46	29,76 ± 2,35	0,069
Ct.MA (mm ²)	8,682 ± 1,54 ^A	14,71 ± 1,20 ^B	14,22 ± 4,13 ^B	0,006
Po.Dm (mm)	0,558 ± 0,03	0,542 ± 0,05	0,522 ± 0,01	0,412
Po.N (1/mm)	1,10 ± 0,09	0,96 ± 0,06	0,998 ± 0,09	0,067
Po.Sp (mm)	0,264 ± 0,03 ^A	0,386 ± 0,02 ^B	0,346 ± 0,04 ^B	0,000
Ct.Po (%)	37,25 ± 1,70 ^A	49,45 ± 2,44 ^B	48,02 ± 4,81 ^{AB}	0,007
Ct.Th (mm)	0,560 ± 0,04	0,559 ± 0,071	0,548 ± 0,02	0,918
<i>Diáfise tibial</i>				
Ct.TV (mm ²)	35,58 ± 1,90 ^{AB}	33,14 ± 2,28 ^A	38,06 ± 1,01 ^B	0,008
Ct.BA (mm ²)	25,90 ± 0,93	25,08 ± 2,57	25,98 ± 0,68	0,829
Ct.MA (mm ²)	9,67 ± 2,40 ^{AB}	8,06 ± 0,54 ^A	12,08 ± 1,02 ^B	0,015
Po.Dm (mm)	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,06	0,975
Po.N (1/mm)	1,08 ± 0,12	1,08 ± 0,03	1,01 ± 0,10	0,302
Po.Sp (mm)	0,26 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,264 ± 0,01	0,254
Ct.Po (%)	52,46 ± 3,24	54,08 ± 2,71	49,14 ± 2,09	0,074
Ct.Th (mm)	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,692

Valores em média ± desvio padrão, n = 5 ossos/grupo. Avaliados por microtomografia óssea.

Letras diferentes significam diferenças significantes com $p < 0,05$ realizados com o teste ANOVA seguido por teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn's (não-paramétrico). Ct.TV: área do volume total; Ct.BA: área óssea; Ct.MA : área medular; Ct.Po: porosidade cortical; Po.Dm: diâmetro do poro; Po.Sp: espaço entre os poros; Po.N: número de poros; Ct.Th: espessura cortical.

Tabela 4 - Parâmetros biomecânicos da diáfise femoral e tibial e do colo femoral.

	CON	HLU	OVX	p value
<i>Diáfise femoral</i>				
Força máxima (N)	99,38 ± 10,5 ^{AB}	94,26 ± 16,46 ^A	113,3 ± 13,97 ^B	0,036
Rigidez (N/mm)	228,2 ± 26,02	232 ± 49,42	226 ± 33,98	0,952
Energia absorvida (mJ)	33,25 ± 6,02 ^A	34,81 ± 7,71 ^A	48,94 ± 9,51 ^B	0,001
<i>Diáfise tibial</i>				
Força máxima (N)	61,01 ± 9,17	64,12 ± 9,61	65,97 ± 8,97	0,600
Rigidez (N/mm)	99,34 ± 15,2	101 ± 17,49	100,6 ± 11,63	0,979
Energia absorvida (mJ)	26,71 ± 5,93	31,9 ± 4,53	31,42 ± 5,19	0,180
<i>Colo femoral</i>				
Força máxima (N)	104,3 ± 16,83	99,08 ± 8,89	107 ± 7,99	0,389
Rigidez (N/mm)	200,1 ± 136,6 ^{AB}	302 ± 132,9 ^A	127,3 ± 64,52 ^B	0,019
Energia absorvida (mJ)	48,29 ± 22,34 ^{AB}	33,66 ± 13,47 ^A	60,26 ± 15,33 ^B	0,016

Valores em média ± desvio padrão.

Letras diferentes significam diferenças significantes entre os grupos ao final do experimento com $p < 0,05$ realizados com o teste ANOVA seguido por teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn's (não-paramétrico). CON: grupo controle; HLU: grupo descarregamento dos membros posteriores; OVX: grupo ovariectomizado.

5 Discussão

Nossos resultados mostram que o desuso apresentou diminuição na densidade mineral óssea, aumento na porosidade cortical do fêmur, bem como diminuição na resistência óssea femoral, levando-o a um maior risco de fratura. Entretanto, o desuso não causou alterações na tíbia. Por outro lado, a deficiência de estrógeno também resultou na diminuição da densidade mineral óssea femoral com grande deterioração na região trabecular tanto no fêmur quanto na tíbia, porem, não apresentou alterações na resistência óssea.

Para avaliar os efeitos da deficiência de estrógeno sobre o metabolismo ósseo, a ovariectomia (OVX) foi realizada em ratas Wistar. A eficácia da cirurgia foi confirmada pela diminuição de 75% da concentração

plasmática de E_2 , aciclicidade estral durante 15 dias após a cirurgia (53), aumento da massa corpórea (54), diminuição da densidade mineral óssea areal (aDMO) e deterioração trabecular, características comuns em ratas ovariectomizadas (55), e, para investigar os efeitos do desuso sobre as propriedades ósseas, nós utilizamos a técnica de descarregamento dos membros posteriores (HLU), durante 21 dias em ratas Wistar (56).

De acordo com os nossos resultados, o grupo HLU mostrou ser mais sensível às alterações da densidade mineral óssea no fêmur do que na tíbia. Similarmente, Lafage-Proust et al. (57) investigaram o efeito do desuso em diferentes sítios esqueléticos em ratos jovens e reportaram que o desuso inibiu o crescimento do fêmur. Por ter amadurecimento mais lento que a tíbia e por acumular grande quantidade de minerais, o fêmur mostrou ser mais sensível às alterações ao desuso.

Tou et al. (58), assim como o nosso estudo, também determinaram os efeitos do descarregamento dos membros posteriores e da ovariectomia sobre a propriedades ósseas em ratas com 6 meses de idade, e reportaram diminuição de 5,5% e 7,3% na DMO do fêmur e tíbia, respectivamente, dos animais OVX. Porém, diferindo dos nossos resultados, o desuso não obteve resposta sobre a DMO, sugerindo que em ratas adultas, como a taxa de turnover ósseo é baixa, a resposta na DMO pode ser atenuada. O período de descarregamento dos membros posteriores utilizado por eles foi de 30 dias, e não 21 como no presente estudo. Além disso, o estudo não analisou a microestrutura trabecular e cortical, se limitando apenas na avaliação da densidade mineral óssea.

Lecoc et al. (59), ao investigar o efeito do desuso e da deficiência de estrógeno sobre a densidade mineral óssea durante 30 dias em ratas com 3 meses de idade, observaram diminuição de 6,36% na DMO da metáfise distal do fêmur em ratas suspensas, porém o mesmo não ocorreu nas ratas privadas de estrógeno, pois a DMO no fêmur distal e proximal em ratas OVX só é estabilizada após 5 semanas de cirurgia (55) e este estudo se limitou em apenas 4 semanas de privação de estrógeno, podendo ter mascarado o efeito

na DMO de ratas OVX. No presente estudo, o tempo de privação de estrógeno foi de 8 semanas, e mostrou ser suficiente para a deterioração óssea.

No grupo HLU, as concentrações plasmáticas de cálcio e fosfatase alcalina ao final do experimento, ou seja, com 27 semanas de idade, diminuíram comparadas as concentrações obtidas no início do experimento, corroborando com a literatura (60). A fosfatase alcalina é usada como marcador de formação óssea (61, 62) e está relacionada com a taxa de formação osteoblástica (63). A diminuição significativa da fosfatase alcalina total no grupo HLU indica diminuição da formação óssea.

Já no grupo OVX o cálcio diminuiu significativamente e a concentração da fosfatase alcalina aumentou, porém sem significância estatística. O cálcio tem a relação direta com a composição óssea (64) e a diminuição de Ca em ratas ovariectomizadas já está bem documentada (33, 65). Além disso, o aumento da fosfatase alcalina se explica pelo aumento do turnover ósseo causada pela a deficiência de estrógeno (65), que eleva a atividade dos osteoblastos. Porém, a atividade osteoblástica não é capaz de remover os osteoclastos da matriz óssea, resultando em perda óssea (66, 67).

A atividade da TRAP é uma das atividades enzimáticas mais abundantes em osteoclastos, e tem sido considerado como marcador para osteoclastos (68). Apesar de não haver diferença estatística entre o início e o fim do experimento nos grupos HLU e OVX, nota-se que, comparado ao grupo CON, a diminuição da atividade da TRAP foi menor nesses grupos. Entretanto, a diminuição no grupo OVX foi atenuada, de apenas 11%, enquanto que o esperado para essa idade, baseado no grupo CON, era de 40%, sugerindo, portanto, aumento da atividade de osteoclastos em ratas privadas de estrógeno que é evidenciada na análise da microtomografia óssea, onde ratas ovariectomizadas tiveram deterioração trabecular tanto no fêmur, quanto na tíbia.

Os resultados obtidos na região trabecular da epífise proximal do fêmur e na metáfise proximal da tíbia após o descarregamento dos membros posteriores, nos mostra que o desuso não foi capaz de alterar a estrutura trabecular em ambos os ossos. A falta da resposta no osso trabecular pode ser

devido à diminuição em osteoblastos (69), pois a primeira mudança observada no animal suspenso é a supressão do crescimento ósseo devido à diminuição dos osteoblastos (60, 70), confirmado com a diminuição da atividade da fosfatase alcalina total nesse grupo. Além disso, a atividade e o número dos osteoclastos são pouco alterados com o desuso (71).

Quando não há estímulo mecânico, os osteócitos, células que estão embutidas na matriz extracelular e que tem função mecanosensorial (72), expressam o gene SOST que produz esclerostina. A esclerostina atua na inibição da via Wnt/b-catenina, diminuindo a produção e atividade dos osteoblastos (73). A sinalização Wnt é um regulador crítico de fornecimento de osteoblastos e massa óssea, portanto, tem papel crucial na regulação da homeostase mineral.

A presença da proteína Wnt ativa várias cascatas de sinalização que resulta na estabilização da proteína b-catenina (74) que transloca-se ao núcleo e se liga ao fator de transcrição celular ativando e expressando genes alvos para a produção da massa óssea (75), que no desuso, essa produção está diminuída.

Os resultados na região trabecular da epífise femoral nas ratas OVX confirmam a osteopenia evidenciado pelo DXA, pois foi observado diminuição do volume ósseo (BV/TV) e espessamento das trabéculas, bem como o aumento da porosidade trabecular comparado ao CON. Todavia, a análise trabecular na metáfise proximal da tíbia mostrou deterioração elevada, com diminuição do volume ósseo, número de trabéculas e aumento do índice do modelo estrutural (SMI) comparado ao CON, e, perda da conectividade, aumento da porosidade total e o espaçamento entre as trabéculas comparado ao HLU, sinalizando fragilidade óssea.

Os dados da micro-ct do osso trabecular utilizando ratas ovariectomizadas corroboram com diversos trabalhos publicados (76, 77). Na menopausa, a maior consequência da deficiência de estrógeno é o aumento da reabsorção óssea seguido de diminuição da formação óssea (66) acelerando a perda trabecular, que leva a perfuração das trabéculas e perda da conectividade (67).

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que o estrógeno reduz a produção de RANKL, além de aumentar a produção de osteoprotegerina (OPG), que diminuirá a diferenciação dos osteoclastos (10). O estrógeno também promove a diminuição plasmática de interleucina-1 e TNF α (11), substâncias que estimulam a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Recentes estudos afirmam que a deficiência desse hormônio atua diretamente sobre os osteoclastos, causando perfuração nos elementos estruturais e descontinuação da estrutura trabecular.

Estudos que fizeram a deleção do receptor de estrógeno ER α em osteoclasto observaram o aumento do número de progenitores dos osteoclastos no osso esponjoso, e esse efeito foi dependente de estrógeno, assegurando que a diminuição deste hormônio tem efeito sobre os osteoclastos no osso esponjoso (78, 79).

Maïmoun et al. (69) investigaram o efeito do desuso por meio da neurectomia (NX) sobre as propriedades trabeculares da tíbia em ratas com 6 meses de idade ovariectomizadas (OVX) e sham. Observaram que em ratas (N-O+), ou seja, ovariectomizadas sem neurectomia, foi predominada a diminuição do número de trabéculas, conduzindo a erosão trabecular, e, em ratas sham neurectomizadas (N+O-), devido à diminuição de osteoblastos, o resultado predominante foi a diminuição da espessura trabecular e não do número de trabéculas. Entretanto, nesse estudo, o nervo ciático foi desnervado em apenas um membro posterior em ratas OVX e sham, o que acreditamos que tenha estimulado o membro posterior contralateral de forma exacerbada, podendo influenciar nos resultados.

No presente estudo, avaliamos também o efeito do desuso e da deficiência de estrógeno sobre o osso cortical femoral e tibial por meio da microtomografia óssea. O grupo HLU apresentou aumento na porosidade total na região cortical do fêmur comparado ao grupo CON. Essa alteração pode ter influenciado no teste de flexão de 3 pontos realizado na diáfise femoral onde a força máxima e a energia absorvida foi menor no grupo HLU comparado ao grupo OVX. Vários trabalhos suportam esse resultado, onde animais suspensos

pela cauda tiveram a força máxima diminuída (56, 80) e diminuição da energia absorvida (69).

Nos últimos anos, muitos estudos estão se voltando as análises corticais pela sua importância na avaliação do risco de fratura, pois a porosidade cortical aumenta a fragilidade óssea, tornando-se importante determinante da resistência óssea (81). Na tíbia, ao analisar o osso cortical, foi observado uma área total menor no grupo HLU comparado ao grupo OVX, porém essa diferença não alterou as propriedades mecânicas da tíbia como esperado. Bloomfield et al. (82) também estudaram o efeito do desuso em diferentes sítios esqueléticos em ratos machos adultos e não encontraram diferenças significantes nas propriedades mecânicas na tíbia, sugerindo que o desuso não exerce efeito biomecânico na tíbia em esqueleto maduro.

O grupo OVX apresentou maior área total e área medular no osso cortical femoral e tibial. O alargamento da cavidade medular é devido o aumento da reabsorção do endóstio e o aumento da área total é devido à aposição no perióstio (40), mecanismo de compensação da perda trabecular (69).

Observações *in vitro* sugerem que ER α pode traduzir as forças mecânicas em sinais de sobrevivência para osteócitos e osteoblastos e que esta função é independente de estrógeno (83). Maria Almeida et al. (78) excluíram ER α em diferentes estágios de diferenciação de células da linhagem dos osteoblastos e descobriram que a aposição periostal se dá pela participação de ER α na transdução de sinais mecânicos atuando na ativação da via Wnt sem a necessidade de estrógeno.

Os testes biomecânicos no colo do fêmur mostraram maior força e energia absorvida no grupo OVX comparado ao grupo HLU e maior energia absorvida no teste de flexão de 3 pontos na diáfise femoral. Na tíbia, apesar de apresentar grande deterioração trabecular, o grupo OVX não apresentou alterações biomecânicas como o esperado. O aumento da área cortical como aposição do perióstio em OVX pode ter protegido as propriedades mecânicas nas ratas ovariectomizadas, pois o aumento da largura óssea bem como a expansão periosteal pode preservar a força óssea (82). Similarmente,

Danielsen et al. (84) reportaram que ratas ovariectomizadas, apesar da reabsorção no endósteo e diminuição da massa óssea, as propriedades biomecânicas não foram alteradas.

Não só o osso cortical, mas também a forma, o tamanho, a orientação e a conectividade das trabéculas podem influenciar na força óssea (85, 86), entretanto as propriedades geométricas do osso cortical parecem ter maior importância. Além disso, 80% do esqueleto é formado por osso cortical e 70% de toda perda óssea apendicular é no osso cortical (87), por isso as propriedades estruturais e geométricas do osso cortical são de suma importância para a predição de risco de fratura (88).

Embora baixo DMO esteja associado com aumento do risco de fratura, a maioria das fraturas ocorre em mulheres sem osteoporose definida (89, 90), e como podemos ver ao analisar os resultados da tíbia obtidos pelo DXA, se utilizarmos apenas a DMO como diagnóstico de osteopenia ou osteoporose, o resultado pode ser subestimado, pois o DXA não tem habilidade de distinguir osso trabecular e cortical (91). Apesar das ratas ovariectomizadas não apresentarem alterações biomecânicas, devemos nos alertar que a microtomografia computadorizada foi realizada após dois meses de cirurgia, e, provavelmente, análise mais tardia poderia alterar as propriedades biomecânicas, pois a susceptibilidade a fratura também é causada pela diminuição óssea trabecular (40), embora os resultados mostrem que a região cortical pode ser mais importante para essa previsão.

Miyagawa et al. (92), ao analisarem o efeito do desuso em ratas sham e ovariectomizadas com 14 semanas de idade, puderam observar que a inatividade causou deterioração no osso cortical e nas propriedades mecânicas, enquanto que ratas OVX não tiveram o mesmo resultado, sugerindo que o osso cortical e as propriedades biomecânicas dependem da atividade física e não de estrógeno. Similarmente, Brouwers et al. (93) concluíram em seu estudo que pacientes acamados tem a sua força mais prejudicada que pacientes na menopausa.

Algumas limitações em nosso estudo devem ser mencionadas. Nós estudamos apenas ratas fêmeas em único período de tempo. Ainda não está

claro se a idade avançada pode influenciar na resposta mecânica e hormonal em diferentes sítios esqueléticos e se ratos machos também respondem a diferentes estímulos. Além disso, como qualquer modelo animal, há limitações comparadas às evidências clínicas, porém estes modelos são capazes de simular as alterações do metabolismo ósseo semelhantes aos humanos, além de nos possibilitar abordagens terapêuticas mais invasivas.

Estes resultados sinalizam que para melhorar a qualidade de detecção da osteoporose na prática clínica, deve-se também incluir estimativa das propriedades geométricas e estruturais do osso cortical, pois estes são preponderantes para análise do risco de fratura sobre os ossos não vertebrais, evitando, assim, gastos com saúde pública, além de possibilitar melhor qualidade de vida aos pacientes.

6 Conclusões

Com base na metodologia utilizada neste estudo e os resultados obtidos, podemos concluir que:

- ❖ A ovariectomia deteriorou o tecido trabecular tibial e femoral sem comprometer o tecido cortical e a resistência óssea;
- ❖ O descarregamento dos membros posteriores desencadeou aumento na porosidade cortical e diminuição na resistência óssea femoral;
- ❖ Embora os grupos HLU e OVX apresentem alterações na densidade mineral óssea, o desuso ou a inatividade física, como em pacientes acamados ou imobilizados, determinou maior perda no tecido cortical podendo ter influenciado na diminuição da resistência óssea em relação à deficiência de estrógeno. Portanto, a análise da estrutura do tecido cortical como a porosidade cortical, e não apenas análise da densidade mineral óssea total, pode ser preponderante para prever o risco de fratura.

Referências

1. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 2012;45(12):863-73.
2. Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone.* 2014;66:46-55.
3. Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(3):268-75.
4. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.
5. Gusmão CVB, Belangero WD. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? *Rev bras ortop.* 2009;44:4.
6. Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42:5-12.
7. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999;145(3):527-38.
8. Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1186-94.
9. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology.* 2001;142(6):2205-12.
10. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):7829-34.
11. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;11(8):1043-51.
12. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(7):2398-402.
13. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45.
14. Cardoso Neto C, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka CK. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistaradulta s: um modelo para estudo da osteoporose. *Rev Cienc Med Biol.* 2006;5(231):8.
15. Sheng ZF, Dai RC, Wu XP, Fang LN, Fan HJ, Liao EY. Regionally specific compensation for bone loss in the tibial trabeculae of estrogen-deficient rats. *Acta Radiol.* 2007;48(5):531-9.
16. Klein-Nulend J, Bacabac RG. Bone adaptation and regeneration – New developments. *International Journal of Modern Physics: Conference Series;* 2012. p. 34.
17. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.* 1999;13 Suppl:S101-12.
18. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;357(9):905-16.

19. Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology*. 2007;148(6):2635-43.
20. Convertino VA, Bloomfield SA, Greenleaf JE. An overview of the issues: physiological effects of bed rest and restricted physical activity. *Med Sci Sports Exerc*. 1997;29(2):187-90.
21. Gerbaix M, Vico L, Ferrari SL, Bonnet N. Periostin expression contributes to cortical bone loss during unloading. *Bone*. 2015;71:94-100.
22. Globus RK, Bikle DD, Morey-Holton E. The temporal response of bone to unloading. *Endocrinology*. 1986;118(2):733-42.
23. Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science*. 1978;201(4361):1138-41.
24. Vico L, Novikov VE, Very JM, Alexandre C. Bone histomorphometric comparison of rat tibial metaphysis after 7-day tail suspension vs. 7-day spaceflight. *Aviat Space Environ Med*. 1991;62(1):26-31.
25. Ralston SH. Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17(4):475-9.
26. Weinreb M, Rodan GA, Thompson DD. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. *Bone*. 1989;10(3):187-94.
27. Jemtland R, Holden M, Reppe S, Olstad OK, Reinholt FP, Gautvik VT, et al. Molecular disease map of bone characterizing the postmenopausal osteoporosis phenotype. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1793-801.
28. Reppe S, Refvem H, Gautvik VT, Olstad OK, Høvring PI, Reinholt FP, et al. Eight genes are highly associated with BMD variation in postmenopausal Caucasian women. *Bone*. 2010;46(3):604-12.
29. Keen RW. Burden of osteoporosis and fractures. *Curr Osteoporos Rep*. 2003;1(2):66-70.
30. Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*. 2004;34(3):443-53.
31. Hefferan TE, Evans GL, Lotinun S, Zhang M, Morey-Holton E, Turner RT. Effect of gender on bone turnover in adult rats during simulated weightlessness. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(5):1775-80.
32. Matsumoto T, Nakayama K, Kodama Y, Fuse H, Nakamura T, Fukumoto S. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. *Bone*. 1998;22(5 Suppl):89S-93S.
33. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991;15(3):175-91.
34. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002;359(9321):1929-36.
35. Ancher Sørensen H, Bech Jensen JE, Helmer Sørensen O. Measurement of regional bone mass in normals and in osteoporotics. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1994;219:42-6.
36. Genant HK, Glüer CC, Lotz JC. Gender differences in bone density, skeletal geometry, and fracture biomechanics. *Radiology*. 1994;190(3):636-40.
37. Nguyen T, Sambrook P, Kelly P, Jones G, Lord S, Freund J, et al. Prediction of osteoporotic fractures by postural instability and bone density. *BMJ*. 1993;307(6912):1111-5.

38. van der Meulen MC, Jepsen KJ, Mikić B. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone*. 2001;29(2):101-4.
39. Long JA, Evans HM. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem Univer Calif*. 1922;6:1-148.
40. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-30.
41. Waynforth HB. *Experimental and surgical technique in the rat*. London and New York: Academic Press; 1980.
42. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(4):1367-77.
43. Wright JW. The effects of a heart puncture blood sample upon body water maintenance in rats. *Physiol Behav*. 1973;10(2):407-10.
44. Daly JA, Ertingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifChem". *Clin Chem*. 1972;18(3):263-5.
45. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem*. 1970;16(5):431-6.
46. Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad Bras Cienc*. 1997;69(4):451-60.
47. Janckila AJ, Parthasarathy RN, Parthasarathy LK, Seelan RS, Hsueh YC, Rissanen J, et al. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol*. 2005;77(2):209-18.
48. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, et al. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2007;22(4):578-88.
49. Hildebrand T, Rüegsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc*. 1997;185:67-75.
50. Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou CL, Jaffre C. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Joint Bone Spine*. 2013;80(5):492-8.
51. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.
52. Shirazi-Fard Y, Kupke JS, Bloomfield SA, Hogan HA. Discordant recovery of bone mass and mechanical properties during prolonged recovery from disuse. *Bone*. 2013;52(1):433-43.
53. LeFevre J, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38(4):780-9.
54. Bauer NB, Khassawna TE, Goldmann F, Stirn M, Ledieu D, Schlewitz G, et al. Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol*. 2015;67(4):287-96.
55. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res*. 2011;29(2):189-96.

56. Falcai MJ, Louzada MJ, de Paula FJ, Okubo R, Volpon JB. A modified technique of rat tail suspension for longer periods of observation. *Aviat Space Environ Med.* 2012;83(12):1176-80.
57. Lafage-Proust MH, Collet P, Dubost JM, Laroche N, Alexandre C, Vico L. Space-related bone mineral redistribution and lack of bone mass recovery after reambulation in young rats. *Am J Physiol.* 1998;274(2 Pt 2):R324-34.
58. Tou JC, Foley A, Yuan YV, Arnaud S, Wade CE, Brown M. The effect of ovariectomy combined with hindlimb unloading and reloading on the long bones of mature Sprague-Dawley rats. *Menopause.* 2008;15(3):494-502.
59. Lecoq B, Potrel-Burgot C, Granier P, Sabatier JP, Marcelli C. Comparison of bone loss induced in female rats by hindlimb unloading, ovariectomy, or both. *Joint Bone Spine.* 2006;73(2):189-95.
60. Bikle DD, Halloran BP. The response of bone to unloading. *J Bone Miner Metab.* 1999;17(4):233-44.
61. Brixen K, Nielsen HK, Eriksen EF, Charles P, Mosekilde L. Efficacy of wheat germ lectin-precipitated alkaline phosphatase in serum as an estimator of bone mineralization rate: comparison to serum total alkaline phosphatase and serum bone Gla-protein. *Calcif Tissue Int.* 1989;44(2):93-8.
62. Charles P, Hasling C, Risteli L, Risteli J, Mosekilde L, Eriksen EF. Assessment of bone formation by biochemical markers in metabolic bone disease: separation between osteoblastic activity at the cell and tissue level. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(6):406-11.
63. Farley JR, Baylink DJ. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism.* 1986;35(6):563-71.
64. Delmas PD. What do we know about biochemical bone markers? *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1991;5(4):817-30.
65. Zhang Y, Lai WP, Leung PC, Wu CF, Wong MS. Short- to mid-term effects of ovariectomy on bone turnover, bone mass and bone strength in rats. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(5):898-903.
66. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(11):576-81.
67. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):699-712.
68. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 1982;34(3):285-90.
69. Maïmoun L, Brennan-Speranza TC, Rizzoli R, Ammann P. Effects of ovariectomy on the changes in microarchitecture and material level properties in response to hind leg disuse in female rats. *Bone.* 2012;51(3):586-91.
70. Morey-Holton ER, Hill EL, Souza KA. Animals and spaceflight: from survival to understanding. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007;7(1):17-25.
71. Oganov VS, Rakhmanov AS, Novikov VE, Zatsepin ST, Rodionova SS, Cann C. The state of human bone tissue during space flight. *Acta Astronaut.* 1991;23:129-33.
72. Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shiode-Fukuda Y, Inoue E, et al. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone.* 2014;60:68-77.

73. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, et al. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2009;24(10):1651-61.
74. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192-205.
75. Burgers TA, Williams BO. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):244-9.
76. Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Jeon Y, Sung JK. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats : Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc.* 2012;51(6):323-7.
77. Jia HB, Ma JX, Ma XL, Yu JT, Feng R, Xu LY, et al. Estrogen alone or in combination with parathyroid hormone can decrease vertebral MEF2 and sclerostin expression and increase vertebral bone mass in ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 2014;25(12):2743-54.
78. Almeida M, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, et al. Estrogen receptor- α signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J Clin Invest.* 2013;123(1):394-404.
79. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* 2007;130(5):811-23.
80. Spatz JM, Ellman R, Cloutier AM, Louis L, van Vliet M, Suva LJ, et al. Sclerostin antibody inhibits skeletal deterioration due to reduced mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 2013;28(4):865-74.
81. Ahmed LA, Shigdel R, Joakimsen RM, Eldevik OP, Eriksen EF, Ghasem-Zadeh A, et al. Measurement of cortical porosity of the proximal femur improves identification of women with nonvertebral fragility fractures. *Osteoporos Int.* 2015.
82. Bloomfield SA, Allen MR, Hogan HA, Delp MD. Site- and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. *Bone.* 2002;31(1):149-57.
83. Aguirre JI, Plotkin LI, Gortazar AR, Millan MM, O'Brien CA, Manolagas SC, et al. A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25501-8.
84. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int.* 1993;52(1):26-33.
85. Compston JE. Connectivity of cancellous bone: assessment and mechanical implications. *Bone.* 1994;15(5):463-6.
86. R H, JD C. Effects of structural variation on Young's modulus of non-human cancellous bone. *Proc Inst Mech Eng H.*1990. p. 43-52.
87. Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, Iuliano-Burns S, Mirams M, Price RI, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet.* 2010;375(9727):1729-36.
88. Augat P, Reeb H, Claes LE. Prediction of fracture load at different skeletal sites by geometric properties of the cortical shell. *J Bone Miner Res.* 1996;11(9):1356-63.

89. Siris ES, Chen YT, Abbott TA, Barrett-Connor E, Miller PD, Wehren LE, et al. Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention to prevent fractures. *Arch Intern Med.* 2004;164(10):1108-12.
90. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone.* 2004;34(1):195-202.
91. Ferretti JL. Perspectives of pQCT technology associated to biomechanical studies in skeletal research employing rat models. *Bone.* 1995;17(4 Suppl):353S-64S.
92. Miyagawa K, Kozai Y, Ito Y, Furuhashi T, Naruse K, Nonaka K, et al. A novel underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines the deteriorated material properties and geometry of cortical bone in the tibia of adult rats. *J Bone Miner Metab.* 2011;29(4):422-36.
93. Brouwers JE, Lambers FM, van Rietbergen B, Ito K, Huiskes R. Comparison of bone loss induced by ovariectomy and neurectomy in rats analyzed by in vivo micro-CT. *J Orthop Res.* 2009;27(11):1521-7.

Anexo



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

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Comparação de dois protocolos experimentais que induzem à osteopenia: Análise da expressão gênica" sob responsabilidade do Pesquisador **MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA** e colaboração de Melise Jacon Peres Ueno está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-01037-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Comparison of two experimental protocols that induce osteopenia: Analysis of gene expression", process number **FOA-01037-2013**, under responsibility of **MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA** and with collaboration of Melise Jacon Peres Ueno agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

Prof. Adj. MARY MARCONDES
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator