

PRISCILLA SCHERLOSKI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO
DA OSTEOPOROSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237d
2004

Santos, Priscilla Scherloski dos, 1974-
Desenvolvimento de um modelo experimental para o
estudo da osteoporose / Priscilla Scherloski dos Santos.
– Viçosa : UFV, 2004.
xvii, 83f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilória.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 77-83.

1. Rato - Osteoporose - Efeito de glicocorticóides. 2.
Rato - Osteoporose - Esterilização. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 636.0885

PRISCILLA SCHERLOSKI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO
DA OSTEOPOROSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 14 de maio de 2004

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Conselheiro)

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira
(Conselheira)

Prof. Rubens Chaves de Oliveira

Prof. Cláudio César Fonseca

Prof^a Marlene I. Vargas Vilória
(Orientadora)

*A Deus,
Aos meus pais: Alfredo e Helena,
Ao meu irmão: Rafael,
Aos meus primos: Sérgio e Cida,
Pela confiança e pelo apoio
em todos os momentos.
Dedico este trabalho a vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida, minha família e todas as pessoas maravilhosas que fazem parte da minha história.

Aos meus amados pais por incentivar, amar, ter sempre a palavra certa no momento certo e por serem o meu porto seguro.

Ao meu adorado irmão por ser amigo, companheiro e cúmplice.

Aos queridos primos Sérgio e Cida por abrirem as portas de sua casa e de suas vidas para mim.

À querida professora Marlene por me receber como estudante ensinando e orientando, mas principalmente por me receber em seu lar e sua família como amiga e como filha.

Ao professor Ricardo por contribuir incansavelmente para conclusão deste trabalho, pela paciência e pela confiança.

Ao professor Rubens pela gentileza de nos receber e pela dedicação para realização deste trabalho.

A professora Maria Ignês pela gentileza de nos receber e colaborar para a realização das análises do experimento.

Ao professor Patarroyo pela atenção, ensinamentos, colaboração e principalmente pela amizade e pelo carinho.

A professora Andréa por estar sempre disposta a auxiliar, pelo companheirismo e pelo carinho.

À minha querida amiga Michelle pelo estímulo, carinho, bons momentos e a amizade que vou levar sempre comigo.

Ao Fabrício pela presença constante na minha vida como companheiro, cúmplice e principalmente como amigo.

Ao Policarpo pela amizade, companheirismo e incansável cooperação para realização deste trabalho.

Aos amigos Mário e Tati pela amizade, companheirismo e excelentes momentos que passamos juntos.

À Gisele pela amizade, estímulo, companheirismo e pela cooperação.

Ao Sidimar pela colaboração, carinho e amizade.

Ao Ferdinan por participar da minha vida como companheiro, amigo e irmão.

Ao Luís pela recente amizade e irmandade.

Aos amigos Richard, Ester, Rafa, Érika, Jéferson, Andréa pelos bons momentos.

Às amigas Claudia e Irma pelo carinho e pela ajuda.

A Pati pela amizade, cumplicidade, maternidade, companheirismo e pelos excelentes momentos que passamos juntas.

À Lisa, Sandra e Lúcia pelo companheirismo e amizade.

Às amigas Cíntia e Silvinha pela amizade e carinho.

Aos estagiários e amigos Paloma, Denise, Jair, Fabio, Leonardo, Marcel, Humberto e Gabriela pela consideração e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos professores do DVT José Antônio Viana, Cláudio César Fonseca, Pacífico Antônio Diniz Belém, Tarcizio Antônio Rego de Paula, Luiz Gonzaga Pompermayer sempre solícitos.

Aos professores Tânia Toledo de Oliveira, Sérgio Luís Pinto da Mata, Marcelo José Vilela, Jorge Clin.

Ao Zé de Oliveira pelo auxílio, pela amizade e por estar sempre sorrindo mesmo quando as coisas estão difíceis.

Aos funcionários do DVT: Rosi, Adão, Cláudio, Maninha, Calzinho, Sérgio, Ulisses, Camilo, Toninho, Etelvina, Heloísa, Divina, Sônia, Batalha, Luís Carlos, Geraldinho e Margarete.

Aos funcionários dos departamentos de Zootecnia, Engenharia Florestal, Bioquímica e do Centro de Ciências Biológicas: Fernando (DZO), Zé Geraldo (DBQ), Luciano (DEF), Monteiro (DZO), Regina (CCB), Maria do Carmo (CCB).

BIOGRAFIA

PRISCILLA SCHERLOSKI DOS SANTOS, filha de Alfredo Juvaldo Nunes dos Santos e Helena Scherloski dos Santos, nascida em 15 de janeiro de 1974, na cidade de Cascavel-Paraná-Brasil.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Brasil, em janeiro de 1994, concluindo sua graduação em abril do ano de 2001.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2001.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE GRÁFICO	ix
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Tecido Ósseo	5
3.1.1 Classificação do Tecido Ósseo segundo Estrutura e Forma.....	6
3.1.2 Células do Tecido Ósseo	7
3.2 Remodelação Óssea e BMU	8
3.3 Fisiologia do Metabolismo Ósseo	10
3.4 Osteoporose	15
3.4.1 Conceito e Classificação	15
3.4.2 Epidemiologia	17
3.4.3 Fatores de Risco	19
3.4.4 Fisiopatologia da Osteoporose	21
3.4.4.1 Fatores que afetam a atividade dos osteoclastos	22
3.4.4.2 Fatores que afetam a atividade dos osteoblastos.....	22

3.4.5 Alterações plasmáticas e no tecido ósseo	23
3.4.6 Alterações biomecânicas	24
3.4.6.1 Estrutura óssea e resistência	24
3.5 Modelos Animais	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Distribuição dos Grupos	29
4.2 Procedimento Cirúrgico	30
4.3 Administração de Glicocorticoide	31
4.4 Coleta de Material para Análises	31
4.4.1 Bioquímica do Plasma	32
4.4.2 Bioquímica Óssea	32
4.4.3 Teste Biomecânico	33
4.5 Análise Estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Análise Quantitativa de Cálcio, Fósforo e Proteínas Totais no Plasma.....	35
5.2 Análise Quantitativa de Cálcio, Fósforo e Magnésio no Osso	38
5.3 Ensaio Biomecânicos	42
5.3.1 Ensaio Mecânico de Flexão	42
5.3.2 Ensaio Mecânico de Compressão	51
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

BMU	- Unidade Básica Multicelular
BMD	- Densidade Mineral Óssea
Ca	- Cálcio
Cbfa 1	- Gene codificador ativador de transcrição de diferenciação de osteoblastos
Célula NK	- Célula <i>Natural Killer</i>
Célula T CD4 ⁺ -Th1, Th2	- Linfócito T CD4 ⁺ (Resposta Imune tipo: Th1 e Th2)
Célula Tc	- Linfócito Tc
CO ₃	- Carbonato
IFG	- Interferon Gama
IGF-1, 2	- Fator de Crescimento semelhante à Insulina-1, 2
IL-1, 3, 6, 8	- Interleucina-1, 3, 6, 8
K	- Potássio
Kgf	- Quilograma-força
LPS	- Lipopolissacarídeo
Mφ	- Macrófagos
Mg	- Magnésio
M-CSF	- Fator Estimulante de Colônia-Macrófagos
N	- Newton
Na	- Sódio
NO	- Óxido Nítrico
PG	- Prostaglandina
PG E ₂	- Prostaglandina endoperóxido com duas ligações insaturadas
PTH	- Paratormônio
RANK-ligante	- Receptor ativador do Fator Nuclear (NF- χ)
ROI	- Oxigênio Reativo Intermediário
TGF- β	- Fator de Crescimento Transformante- β
TNF- α , β	- Fator de Necrose Tumoral- α , β

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1.	Concentrações plasmáticas médias de fósforo nos grupos de machos II e III.....	36
Gráfico 2.	Concentrações plasmáticas médias de cálcio nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	37
Gráfico 3.	Concentrações plasmáticas médias de fósforo nos grupos de fêmeas VI, VII e VIII.....	37
Gráfico 4.	Concentrações médias de proteínas plasmáticas nos grupos de fêmeas V e VII.....	38
Gráfico 5.	Concentração média de fósforo no úmero nos grupos de machos I, II, III e IV.....	39
Gráfico 6.	Concentrações médias de magnésio no úmero nos grupos de fêmeas V e VIII.....	41
Gráfico 7.	Médias de força máxima até o ponto de ruptura obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II e IV.....	43
Gráfico 8.	Médias de deformação máxima até o ponto de ruptura obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II e IV.....	43
Gráfico 9.	Médias de força até o limite de proporcionalidade obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II e IV.....	44
Gráfico 10.	Médias de deformação até o limite de proporcionalidade obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I e IV.....	45

Gráfico 11.	Comparação de médias de resiliência entre tratamentos e períodos de coleta dos grupos I e IV.....	47
Gráfico 12.	Comparação de médias de rigidez entre tratamentos e períodos de coleta dos grupos I, II e IV.....	47
Gráfico 13.	Comparação das médias de força até o limite de proporcionalidade entre períodos de coleta dos grupos I, II, III e IV.....	53
Gráfico 14.	Comparação das médias de contração até o limite de proporcionalidade entre períodos de coleta dos grupos I, II e III.....	53
Gráfico 15.	Médias de compressão obtidas em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.....	54

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1.	Fatores relacionados com a formação e reabsorção óssea.....	15
Quadro 2.	Classificação da Osteoporose.....	16
Quadro 3.	Fatores de risco para Osteoporose.....	20
Quadro 4.	Alterações celulares relacionadas às três causas mais comuns de perda óssea.....	22
Quadro 5.	Distribuição dos grupos experimentais nas diferentes coletas.....	30

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1.	Concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e proteínas totais nos grupos de machos I, II, III e IV.....	35
Tabela 2.	Comparação de médias entre tratamentos de proteínas plasmáticas dos grupos I, II, III e IV.....	36
Tabela 3.	Concentrações plasmáticas médias de cálcio, fósforo e proteínas totais nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	37
Tabela 4.	Concentrações médias de fósforo, cálcio e magnésio do úmero nos grupos de machos I, II, III e IV.....	39
Tabela 5.	Comparação de médias entre tratamentos de magnésio no úmero dos grupos I, II, III e IV.....	39
Tabela 6.	Concentrações médias de fósforo, cálcio e magnésio do úmero nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	40
Tabela 7.	Comparação de médias de fósforo entre tratamentos do úmero dos grupos V, VI, VII e VIII.....	40
Tabela 8.	Comparação de médias de cálcio entre tratamentos no úmero dos grupos V, VI, VII e VIII.....	40
Tabela 9.	Médias de força e deformação máximas até o ponto de ruptura obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II, III e IV.....	42
Tabela 10.	Médias de força e deformação até o limite de proporcionalidade obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II, III e IV.....	44

Tabela 11.	Médias de tenacidade, resiliência e rigidez obtidas por flexão em tibia nos grupos de machos I, II, III e IV.....	46
Tabela 12.	Comparação de médias de tenacidade entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.....	46
Tabela 13.	Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.....	46
Tabela 14.	Comparação de médias de rigidez entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.....	47
Tabela 15.	Médias de força e deformação máximas até o ponto de ruptura obtidas por flexão em tibia nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	48
Tabela 16.	Comparação de médias de força máxima até o ponto de ruptura entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	48
Tabela 17.	Médias de força e deformação até o limite de proporcionalidade obtidas por flexão em tibia nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	49
Tabela 18.	Comparação de médias de força até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	49
Tabela 19.	Comparação de médias de deformação até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	49
Tabela 20.	Médias de tenacidade, resiliência, e rigidez obtidas por flexão em tibia nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	50
Tabela 21.	Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	50
Tabela 22.	Comparação de médias de rigidez entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	51
Tabela 23.	Médias de força e deformação máximas até o ponto de ruptura obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.....	51
Tabela 24.	Comparação de médias de deformação máxima até o ponto de ruptura entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.....	52

Tabela 25.	Médias de força e contração até o limite de proporcionalidade obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.....	52
Tabela 26.	Comparação de médias de contração até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.....	53
Tabela 27.	Médias de compressão e resiliência obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.....	54
Tabela 28.	Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.....	55
Tabela 29.	Médias de força e deformação máximas até o ponto de ruptura obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	55
Tabela 30.	Comparação de médias de força máxima até o ponto de ruptura entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	56
Tabela 31.	Médias de força e contração até o limite de proporcionalidade obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	56
Tabela 32.	Comparação de médias de força até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	57
Tabela 33.	Comparação de médias de contração até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	57
Tabela 34.	Médias de compressão e resiliência obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.....	58
Tabela 35.	Comparação de médias de compressão entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	58
Tabela 36.	Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.....	58

RESUMO

SANTOS, Priscilla Scherloski dos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2004. **Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Tânia Toledo de Oliveira.

A osteoporose é uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do esqueleto, levando a uma acentuada fragilidade óssea e a um conseqüente aumento do risco de fraturas. Atualmente considera-se a osteoporose como um dos maiores e mais preocupantes problemas de saúde do mundo, que atinge homens e mulheres. O modelo animal com ratos (*Rattus norvegicus*) está sendo utilizado porque permite o acesso a informações sobre a qualidade e estrutura ósseas que não seriam obtidas em pacientes de triagem clínica, sendo portanto agentes fundamentais para se realizar uma mensuração eficaz e segura da qualidade óssea. A proposta deste modelo é estabelecer a osteoporose seja por meio da castração, ou da administração de glicocorticóide, ou ainda, pela associação da castração com a administração de glicocorticóide, tanto em machos como em fêmeas, e avaliar a partir de que momento isto ocorre. Para realização do experimento foram utilizados 192 ratos adultos (96 machos e 96 fêmeas). Os animais foram divididos em oito grupos com 24 ratos em cada: grupo I – machos controle; grupo II – machos castrados; grupo III – machos com terapia de glicocorticóide; grupo IV – machos castrados com terapia de glicocorticóide; grupo V – fêmeas controle; grupo VI – fêmeas castradas; grupo VII – fêmeas com terapia de glicocorticóide; grupo VIII – fêmeas castradas com terapia de glicocorticóide. As coletas foram realizadas em todos os grupos aos 14, 28, 42

e 56 dias após o início da administração do glicocorticóide. Foram realizadas análise plasmática de cálcio, fósforo e proteínas totais; análise quantitativa de cálcio, fósforo e magnésio do úmero; teste biomecânico de flexão em tibia e teste biomecânico de compressão em vértebra lombar (L5). Associando-se os resultados obtidos, todos os grupos experimentais apresentaram concentrações plasmáticas normais de cálcio:fósforo (1:1 a 2:1) e concentrações ósseas de cálcio:fósforo (2:1) inferiores ao normal, com exceção dos grupos controle. Com relação aos testes biomecânicos nos machos, o grupo IV se apresentou com menor resistência a fratura óssea, seguido do grupo III e do grupo II quando comparados ao grupo controle. Sendo que nos grupos de fêmeas se constatou que o grupo VI teve uma perda óssea mínima, indicada principalmente pelo desequilíbrio da concentração óssea de cálcio:fósforo e pela redução da rigidez observada nos testes biomecânicos. Já os grupos VII e VIII, apresentaram tanto concentração óssea inadequada de cálcio:fósforo como fragilidade óssea, que foi observada nos testes de flexão e compressão, considerando que o grupo VII apresentou menor média de rigidez e o grupo VIII menor resistência a fratura tanto em vértebra L5 como em tibia com relação ao grupo controle.

ABSTRACT

SANTOS, Priscilla Scherloski dos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, May of 2004. **Development of an experimental model to study osteoporosis.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilória. Committee members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Tânia Toledo de Oliveira.

Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass and deterioration of the microarchitecture of the skeleton, leading to an accentuated bone fragility and a consequent increase in the risk of fractures. Nowadays osteoporosis is being considered one of the largest and more preoccupying health problems in the world, which strikes men and women. An animal model with mice (*Rattus norvegicus*) is being used because it allows the access to information on the quality and bone structure that otherwise would not be obtained in patients of clinical selection, being therefore fundamental agents to accomplish an effective and safe measurement of the bone quality. The proposal of this model is to cause osteoporosis through castration, glucocorticoid administration, or the association of both, in males and females, and to evaluate that moment the disease starts. For the accomplishment of the experiment 192 adult mice were used (96 males and 96 females). They were divided in eight groups with 24 animals in each: group I - male control; group II - castrated males; group III - males with glucocorticoid therapy; group IV - castrated males with glucocorticoid therapy; group V - female control; group VI - castrated females; group VII - females with glucocorticoid therapy; group VIII - castrated females with glicocorticóide therapy. The collections took place to the 14, 28, 42 and 56 days after beginning of the administrating glucocorticoid in all the groups. It was performed plasmatic analysis of calcium, phosphorus and total proteins; quantitative analysis of calcium, phosphorus and magnesium of

the humerus; flexing biomechanic test in shinbone and compression biomechanic test in lumbar vertebra (L5). Comparing the obtained results, all the experimental groups presented normal plasmatic concentrations of calcium:phosphorus (1:1 to 2:1) and bone concentrations of calcium:phosphorus (2:1) inferior to the normal rate, except for the control groups. In regarding to the biomechanic tests with males, the group IV showed smaller resistance to bone fracture, following by the group III and the group II when compared to the control group. In the groups of females it was verified that the group VI had a minimum bone loss, indicated mainly by the unbalance of the concentration of calcium:phosphorus in the bone and by the reduction of the rigidity observed in the biomechanic tests. On the other hand, the groups VII and VIII, presented inadequate bone concentration of calcium:phosphorus and bone fragility, which was observed in the flexing and compression tests, considering that the group VII presented minor rigidity average and the group VIII smaller resistance to fracture vertebra L5 and in shinbone compared to the control group.

1- INTRODUÇÃO

As desordens músculo-esqueléticas são as causas mais comuns de dores intensas prolongadas e incapacidade física que atingem milhares de pessoas em todo o mundo. Sendo assim, doenças como a osteoporose têm um impacto expressivo no indivíduo, na sociedade e nos custos sociais. E esta tendência deve crescer de maneira significativa nas próximas décadas com o aumento do número de idosos e com as mudanças no estilo de vida que estão ocorrendo no mundo (WHO, 1999).

No entanto, existem modos efetivos de prevenir ou tratar estas condições que causam incapacitação. As Nações Unidas, a Organização Mundial da Saúde, e outras organizações nacionais e internacionais bem como profissionais da saúde estão trabalhando globalmente com o chamado Movimento da Década de Ossos e Articulações (2000-2010) para melhorar a qualidade de vida de pessoas com problemas músculo-esqueléticos (WOOLF, 1999).

A osteoporose, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde, é uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do esqueleto, levando a uma acentuada fragilidade óssea e a um conseqüente aumento do risco de fraturas. Cerca de 1/3 das mulheres brancas acima de 65 anos são portadoras de osteoporose e há uma estimativa prevendo que 50% das mulheres acima de 75 anos possam sofrer alguma fratura osteoporótica. E embora os homens apresentem osteoporose numa proporção substancialmente inferior às mulheres, estima-se que um homem branco acima de 60 anos de idade tem 25% de chance de sofrer uma fratura osteoporótica (WHO, 1999).

A osteoporose é uma doença que pode se desenvolver pela deficiência de hormônios sexuais, pela senescência ou pelo uso excessivo de glicocorticóides, considerando-se, no entanto, que esses fatores podem agir de forma independente na perda óssea (MANOLAGAS, 2000). Essa enfermidade pode ser primária ou secundária, sendo que a forma primária é classificada em tipo I e tipo II. No tipo I ou pós-menopausa, associa-se uma rápida perda óssea, enquanto que, no tipo II ou senil, relaciona-se à deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea. A osteoporose secundária é decorrente de processos inflamatórios, alterações endócrinas, medicamentos como corticosteróides, hormônios tireoidianos, anticonvulsivantes (GALI, 2001; GENNARI et al., 2002).

Entre os fatores considerados de risco, individuais ou ambientais, para a manifestação da osteoporose primária está a etnia, o estilo de vida (tabagismo, alcoolismo, sedentarismo), a senescência. E ainda, menopausa e histórico materno de fratura como fatores ligados diretamente às mulheres (OTT, 1998). Com relação aos fatores associados à osteoporose secundária está a anorexia, fibrose cística, insuficiência renal, doença hepática, depressão, hipercalciúria, má absorção, desordens endócrinas e metabólicas (hipogonadismo, hiperparatireoidismo, síndrome de Cushing, acidose), doenças hereditárias do esqueleto (osteogênese imperfeita, raquitismo), medicamentos (corticosteróides, heparina), lúpus sistêmico (GENNARI et al., 2002; OTT, 1998).

Para esclarecer a etiologia e melhorar a conduta preventiva perante a osteoporose é necessário estabelecer um modelo animal apropriado para validar uma terapia segura e eficaz (THOMPSON et al., 1995; THORNDIKE et al., 1998). De forma que, no intuito de selecionar um modelo animal adequado deve-se levar em consideração uma variedade de fatores: modelo apropriado para deficiência de estrógeno; homogeneidade genética do organismo; conhecimento anterior de propriedades biológicas; custo e viabilidade; fácil manipulação experimental; considerações ecológicas; implicações éticas e sociais (THORNDIKE & TURNER, 1998).

Segundo os mesmos autores, o modelo animal mais utilizado é o rato (*Rattus norvegicus*) pelo fato de apresentarem baixo custo, serem animais de fácil

manuseio, não apresentarem implicações sociais e possuírem curto período de vida facilitando o estudo dos efeitos do envelhecimento no osso.

THOMPSON et al. (1995) também recomendam utilizar ratas castradas como modelo de osteoporose porque fornecem informações sobre a qualidade óssea, ou seja, estrutura das trabéculas, tamanho dos cristais de hidroxiapatita e viabilidade das células ósseas (OTT, 1998), que não podem ser obtidas em pacientes humanos.

Este modelo animal foi selecionado por se apresentar adequado para um estudo direto que esclareça detalhes da patogênese da osteoporose que ainda permanecem obscuros.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Avaliar se a esterilização (ovariectomia e orquiectomia) e a administração de glicocorticóide em ratos adultos definem o aparecimento e progressão da osteoporose.

2.2 – Objetivos específicos

1. Avaliar a fragilidade óssea e o risco de fratura por meio de testes biomecânicos;
2. Avaliar a concentração plasmática de cálcio, fósforo e proteínas totais;
3. Avaliar a concentração de cálcio, fósforo e magnésio no osso.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido altamente especializado e dinâmico que está em constante regeneração (OTT, 1998; COHEN & ROE, 2000; JUNQUEIRA, et al., 2000; MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000; KALFAS, 2001; GENNARI et al., 2002). Constituído por diversas células, matriz mineralizada e não mineralizada de tecido conjuntivo, e espaços que incluem a medula óssea, canais vasculares, canalículos e lacunas. Durante o desenvolvimento e crescimento, o esqueleto é esculpido em forma e tamanho pela remoção de osso de um local e deposição em outro diferente; este processo é chamado modelação. Quando o esqueleto atinge a “maturidade”, a regeneração continua em vários locais simultaneamente, onde o osso existente é substituído por osso novo, sendo este processo chamado de remodelação (KARSENTY, 2000; MANOLAGAS, 2000).

O tecido ósseo é composto por elementos orgânicos e inorgânicos, sendo que aproximadamente 20% é água (KALFAS, 2001). A matriz óssea é composta em sua parte inorgânica (65%) por cálcio e fosfato, que formam uma estrutura cristalina denominada hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, e por outros íons como Na, K, Mg, CO_3 em diferentes proporções. A parte orgânica (35%) é composta aproximadamente por 90% de colágeno, mucopolissacarídeos e células, sendo responsável pela relativa flexibilidade óssea (ROBBINS, 1994; KALFAS, 2001).

3.1.1- Classificação do tecido ósseo segundo estrutura e forma

A arquitetura da maioria dos ossos é semelhante, sendo composta de osso do tipo trabecular (esponjoso) e do tipo compacto (cortical) (ROSS & ROMRELL, 1993; MUNDY, 2000). O osso do tipo trabecular imaturo é encontrado durante o desenvolvimento embrionário, a reparação de fraturas e em algumas patologias como hiperparatireoidismo. Este tipo de tecido ósseo é composto por feixes de colágeno arranjados aleatoriamente e espaços vasculares formados irregularmente, revestidos por osteoblastos. O osso trabecular imaturo é normalmente remodelado e substituído por osso cortical ou trabecular (KALFAS, 2001).

No osso esponjoso, as trabéculas de tecido mineralizado se interconectam formando uma rede resistente a cargas mecânicas, permanecendo os espaços vazios entre estas, preenchidos por medula óssea (ROSS & ROMRELL, 1993; KALFAS, 2001). Este tecido ósseo é remodelado continuamente nas superfícies endosteais (KALFAS, 2001).

O osso cortical apresenta-se de forma compacta ao redor do componente trabecular e contribui para a manutenção da sua integridade estrutural (ROSS & ROMRELL, 1993; UDDO, 2002).

O tecido ósseo trabecular e o compacto apresentam-se em diferentes proporções dependendo da forma do osso. Segundo a estrutura os ossos são classificados em longos, curtos, planos e irregulares. Os ossos longos como a tíbia, por exemplo, têm as extremidades denominadas de epífises e sua extensão de diáfise, a porção que sobressai da epífise diretamente contígua à diáfise é chamada metáfise. No caso dos ossos longos, a epífise possui maior quantidade de osso trabecular e menor de cortical, enquanto que na diáfise ocorre o contrário. Os ossos irregulares como, por exemplo, as vértebras, têm uma forma complexa que não se ajusta às outras classificações, sendo uma combinação dos tipos acima (ROSS & ROMRELL, 1993).

Os ossos que constituem os esqueletos axial e apendicular são revestidos externamente pelo perióstio e internamente nas superfícies medulares pelo endóstio (SEEMAN, 1999; KALFAS, 2001). Esta massa é determinada pela modelação e remodelação absoluta e relativa dessas superfícies durante o

crescimento e envelhecimento. Sua separação durante o crescimento pela expansão periosteal e aposição endocortical aumenta a massa mineral cortical. A espessura das trabéculas aumenta pela modelação e remodelação que ocorre nas superfícies trabeculares (SEEMAN, 1999).

3.1.2 Células do tecido ósseo

Os osteoclastos e os osteoblastos são células derivadas de precursores originados na medula óssea. Os precursores dos osteoblastos são células multipotentes de linhagem mesenquimal que também originam células estromais, condrócitos, adipócitos e células musculares, enquanto que os precursores dos osteoclastos são células hematopoiéticas da linhagem de macrófago/monócito (ALBERTS et al., 1997; BAKER, 2000; MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000).

Osteoclastos são células grandes, multinucleadas, móveis que, quando ativas, repousam diretamente sobre a superfície óssea fazendo reabsorção da matriz óssea calcificada. O tempo médio de vida de um osteoclasto é de duas a três semanas (ROSS & ROMRELL, 1993; MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000).

Osteoblastos são células diferenciadas, cúbicas ou poligonais, que produzem e secretam proteínas que constituem a matriz óssea. O produto mais secretado por essas células é o colágeno do tipo I (ROSS & ROMRELL, 1993; MANOLAGAS, 2000). Os osteoblastos sintetizam, entre outras, osteocalcina e osteonectina que constituem de 40% a 50% das proteínas não colagenosas do tecido ósseo, além de regular as concentrações locais de cálcio e fosfato e promover a formação da hidroxiapatita (BAKER, 2000; MANOLAGAS, 2000).

Os osteoblastos secretam osteóide, matriz orgânica não mineralizada, que posteriormente sofre mineralização proporcionando rigidez e resistência ao osso, sendo as únicas células ósseas que possuem receptores para o hormônio da paratireóide (BAKER, 2000; KALFAS, 2001). A síntese da matriz pelo osteoblasto determina o volume ósseo, mas não sua densidade. A mineralização da matriz aumenta a densidade do osso pela eliminação da água, mas não altera

o seu volume. O osteoblasto quando ativo tem aproximadamente doze semanas de vida (MANOLAGAS, 2000).

Os osteoblastos são relacionados diretamente com o *Cbfa 1*, que é um gene que codifica um fator de transcrição cuja função é crítica tanto para diferenciação de osteoblastos como para expressão de gene para matriz extracelular. O *Cbfa 1* é o único ativador de transcrição de diferenciação de osteoblasto conhecido, sendo considerado um marcador molecular de osteogênese (DUCY et al., 2000; KARSENTY, 2000).

O *Cbfa 1* possui características de ativador de transcrição de diferenciação celular, tais como: ser expresso em células destinadas a ser osteoblastos mas que não estão diferenciadas ainda; não ser expresso em outros tipos de células em níveis significativos; regular a expressão da maioria dos genes expressos nos osteoblastos, em particular aqueles que codificam a matriz extracelular; a transferência de *Cbfa 1* em células não osteoblásticas induz a expressão de genes osteoblásticos específicos (KARSENTY, 2000).

Os osteócitos são células ósseas maduras, as quais foram previamente osteoblastos, que incluídos nas superfícies periostais e endosteais, passam a ser responsáveis pela manutenção da matriz mineralizada como células de revestimento (ROSS & ROMRELL, 1993; KALFAS, 2001). Os osteócitos dentro da matriz são regularmente espaçados e comunicam-se uns com os outros e com outras células na superfície óssea via múltiplas extensões de sua membrana plasmática através dos canalículos da matriz. Estas células ósseas detectam alterações no fluxo do fluido intersticial produzido por forças mecânicas através dos canalículos e retificam alterações nos níveis de hormônios, como estrógenos e glicocorticóides, os quais influenciam sua sobrevivência. Portanto, a neutralização da atividade dos osteócitos, os quais atuam de forma interconectada no tecido ósseo, contribuiria para o aumento da fragilidade óssea (MANOLAGAS, 2000).

3.2- Remodelação óssea e BMU (Unidade Básica Multicelular)

No esqueleto adulto humano saudável todos os osteoblastos e osteoclastos pertencem a uma estrutura temporária única conhecida como

unidade básica multicelular (BMU) que realiza a remodelação óssea (OTT, 1998; MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000).

A remodelação óssea é um processo fisiológico celular observado nos vertebrados que visa manter constante a massa óssea entre o fim da puberdade e o tempo em que haverá redução intensa ou término da função gonadal (HABERLAND et al., 2001; KARSENTY, 2000).

PAPATHANASOPOULOU et al. (2002) acreditam que a remodelação óssea inclui todos os processos simultâneos pelos quais o tecido ósseo adulto altera seu tamanho, forma e estrutura em resposta a circunstâncias mecânicas às quais é submetido. Levando em consideração que o osso é descrito como um tecido poroso saturado, com osteócitos e fluido extracelular, estes pesquisadores acreditam que sob condições de resistência mecânica ao fluxo do fluido através dos poros da matriz óssea, se compele os osteócitos a regular o processo de remodelação óssea. O processo de remodelação óssea é responsável pela completa regeneração do esqueleto adulto humano a cada 10 anos (MANOLAGAS, 2000).

A massa óssea nos adultos é mantida localmente pelo balanço entre reabsorção e formação óssea (HARADA & RODAN, 2003), ou seja, o esqueleto adulto está em constante processo de remodelação (MANOLAGAS, 2000). A BMU possui um tempo médio de vida de seis a nove meses (MANOLAGAS, 2000; WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000), durante o qual promove o recrutamento de osteoclastos, que por sua vez atraem osteoblastos de seus respectivos progenitores na medula óssea (MANOLAGAS, 2000). Os osteoclastos são ativos em uma BMU por duas semanas num mesmo local da superfície óssea (OTT, 1998; BAKER, 2000), e logo após morrem por apoptose sendo rapidamente removidos por fagocitose (WEINSTEIN & MANOLAGAS, 2000). Estas células liberam mediadores químicos durante a reabsorção, dentre os quais interleucinas e fatores de crescimento que atuam como quimiotáticos para os osteoblastos (OTT, 1998; BAKER, 2000).

Segundo OTT (1998), os osteoblastos ativos secretam osteóide que preenche lentamente a cavidade formada pela reabsorção. Quando o osteóide atinge 6µm de espessura começa a ser mineralizado, processo este que é regulado também pelos osteoclastos. Durante meses a cavidade vai sendo

preenchida o que deixa os cristais de hidroxiapatita mais próximos e a densidade óssea mais elevada. A maioria dos osteoblastos envolvidos torna-se parte das células de revestimento que participam da liberação de cálcio dos ossos e o restante permanece no osso como osteócito. Na conformação da BMU existe um capilar vascular central, um suprimento nervoso, sendo associada também ao tecido conjuntivo (MANOLAGAS, 2000).

Após cada dano ao tecido ósseo ou estresse mecânico desenvolvem-se mais unidades de BMU mediadas por interleucinas e fatores de crescimento (OTT, 1998). E no caso de um tecido ósseo normal há um intervalo de dois a cinco anos para que haja remodelação óssea sucessiva no mesmo local (MANOLAGAS, 2000).

3.3- Fisiologia do metabolismo ósseo

É importante conhecer as peculiaridades do metabolismo ósseo humano relacionadas diretamente ao sexo. Dentre elas estão o pico de massa óssea que corresponde à quantidade máxima de massa óssea que um indivíduo acumula desde o nascimento até a maturidade do esqueleto, momento em que começa a perda associada ao envelhecimento (ROSEN, 2000; UDDO, 2002).

A massa óssea média para a idade (ou inadequada) pode ser considerada uma conseqüência de acúmulo insuficiente de osso durante a vida de adulto jovem (baixo pico de massa óssea) ou de excessiva perda óssea, ou de ambas as condições. O pico de massa óssea é adquirido entre 20 e 30 anos de idade, regulado por forte controle genético e parece ser influenciado por fatores hormonais e estilo de vida, como condicionamento físico e cálcio na dieta (GENNARI et al., 2002).

No pico de massa óssea, a atividade das células formadoras de tecido ósseo equivale à atividade das células de reabsorção e o tamanho do esqueleto permanece inalterado e estável até o fim da década de quarenta anos e início da década de cinquenta (MANOLAGAS, 2000; GENNARI et al., 2002). A mulher tem uma fase de perda rápida durante os 5 a 10 anos subseqüentes à menopausa devido à perda dos estrógenos (MANOLAGAS, 2000; RIGGS et al.; 2002). No homem esta fase é obscura,

porque há um declínio lento na produção de esteróides sexuais (MANOLAGAS, 2000). Logo depois da década de quarenta anos, a massa óssea começa a diminuir progressivamente em homens e mulheres (SEEMAN, 1999; GENNARI et al., 2002).

Além da rápida perda de massa óssea após a menopausa, as mulheres acumulam menos massa esquelética que os homens durante o crescimento, particularmente na puberdade (SEEMAN, 1999; MANOLAGAS, 2000). Então, os homens são mais altos que as mulheres porque eles têm um período maior de crescimento, ao redor de dois anos na fase da pré-puberdade, a velocidade de crescimento é maior durante a puberdade e a duração deste impulso no crescimento é mais extenso do que nas mulheres (SEEMAN, 1999), razão pela qual elas apresentam ossos menores com corticais mais finas e diâmetro reduzido (MANOLAGAS, 2000).

O controle da formação e reabsorção óssea é complexo e é regulado em nível local e sistêmico por processos autócrinos, parácrinos e endócrinos. Os fatores locais incluem as citocinas (autócrinas e parácrinas), fatores de crescimento, óxido nítrico, comunicação célula-célula e sinais resultantes da resistência mecânica sofrida pelo tecido ósseo. O controle sistêmico é exercido pela ação das citocinas, fatores de crescimento e hormônios. A regulação endócrina é mediada por hormônios como a calcitonina, o paratormônio, a vitamina D e os hormônios sexuais que são importantes reguladores da função de células ósseas e podem desencadear um crescimento ou metabolismo ósseo anormal (ROSEN, 2000; GENNARI et al., 2002).

Os esteróides sexuais são muito importantes para o desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo (GENNARI et al., 2002; HARADA & RODAN, 2003). A preservação do esqueleto pelo estrógeno nas fêmeas é relacionada evolutivamente com a necessidade de armazenar cálcio para o desenvolvimento embrionário do esqueleto. Nos mamíferos adultos, tanto machos quanto fêmeas, incluindo os humanos, os estrógenos inibem a reabsorção óssea pela redução do número de osteoclastos (HARADA & RODAN, 2003) e participam da regulação do metabolismo do cálcio no osso cortical e esponjoso (GENNARI et al., 2002).

O mecanismo de manutenção do esqueleto mais conhecido, envolve os precursores da linhagem monócito/macrófago/osteoclasto, através dos efeitos reguladores de citocinas, incluindo interleucinas 1, 6, (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e prostaglandinas (PGs) (ROSEN, 2000; HARADA & RODAN, 2003). Os estrógenos são necessários para fechar as placas de crescimento das epífises e para fazer a manutenção da massa óssea após a puberdade (GENNARI et al., 2002; HARADA & RODAN, 2003).

Os andrógenos têm maior influência na regulação do metabolismo ósseo porque devido ao seu metabolismo periférico podem atuar diretamente no osso, via receptor de andrógenos, ou indiretamente, via receptor de estrógenos depois de aromatizados para estrógenos (SEEMAN, 1999; GENNARI et al., 2002).

A testosterona ou andrógeno não aromatizado, dihidrotestosterona, estimula a formação óssea periosteal e crescimento radial no macho determinando o tamanho do osso (SEEMAN, 1999; RIGGS et al., 2002). Este esteróide sexual é responsável pelo fenótipo que caracteriza os machos com um esqueleto maior, afetando o metabolismo ósseo de diversas maneiras. A testosterona pode ser convertida pela aromatase em estrógeno podendo inibir a reabsorção óssea e estimular a formação tanto em machos quanto em fêmeas (HARADA & RODAN, 2003). A deficiência de testosterona reduz o crescimento periosteal, resultando em tronco e membros menores nos machos (SEEMAN, 1999).

Entre as funções dos ossos estão a manutenção dos níveis de cálcio, suporte mecânico para os tecidos moles, atuação como alavancas para a ação muscular, suporte para a hematopoiese e abrigo para o encéfalo e coluna vertebral. Deve ser lembrado que, para o cálcio ser liberado do tecido ósseo deve haver reabsorção óssea (MANOLAGAS, 2000).

Os hormônios fundamentais na regulação do cálcio, fosfato e magnésio são o paratormônio (PTH), a vitamina D [1,25(OH)₂] e a calcitonina, sendo suas ações similares para o cálcio e magnésio (SARIS et al., 2000). Ressalta-se que os principais mediadores da reabsorção óssea são PTH e a vitamina D (NORDIN, 1997; HARADA & RODAN, 2003), que funcionam como potentes estimuladores da formação de osteoclastos. A habilidade desses hormônios para estimular o desenvolvimento de osteoclastos e para regular a absorção e excreção de cálcio

pelo intestino e rins, respectivamente, são elementos chave para a homeostasia extracelular de cálcio (MANOLAGAS, 2000).

O PTH mantém o nível de cálcio sérico pelo aumento da reabsorção óssea (SWENSON & REECE, 1993; ROUX et al., 1998; MANELLI & GUISTINA, 2000; HULLEY et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; McILWAIN, 2003), pela reabsorção renal de cálcio e pela ativação da vitamina D com conseqüente aumento da absorção intestinal de cálcio (ROUX et al., 1998; COHEN & ROE, 2000; HULLEY et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; McILWAIN, 2003). Além disso, também reduz a reabsorção renal de fósforo, resultando em uma excreção elevada de fosfato, ou seja, baixa concentração de fosfato sérico e manutenção de cálcio (SWENSON & REECE, 1993). Relata-se também que o PTH libera magnésio do osso e aumenta sua absorção intestinal. Assim os níveis de magnésio devem influenciar a secreção de PTH pelo sistema de *feedback*, ou seja, no caso de uma hipermagnesemia ocorre supressão da secreção de PTH causando distúrbios na homeostasia do cálcio (SARIS et al., 2000).

Os níveis de PTH aumentam com a idade, possivelmente em resposta ao decréscimo de absorção intestinal de cálcio, devendo contribuir também para o aumento de perda óssea relacionada com a idade (COHEN & ROE, 2000).

A calcitonina é um dos hormônios clássicos na regulação óssea, produzido pelas células C (parafoliculares) da tireóide (GALI, 2001), que atua inibindo o desenvolvimento e atividade dos osteoclastos e ainda promove a apoptose destes (MANOLAGAS, 2000) ou causa depressão da atividade osteoclástica (SWENSON & REECE, 1993). Embora a calcitonina tenha propriedades antireabsortivas, o seu uso terapêutico em doenças ósseas que apresentam aumento de reabsorção ainda está sendo estudado, sendo que o papel deste hormônio na fisiologia humana permanece questionável (MANOLAGAS, 2000).

O aumento em comprimento dos membros na deficiência de estrógenos é dependente do hormônio do crescimento (SEEMAN, 1999). O hormônio do crescimento é liberado pelo lobo anterior da glândula hipófise que através da circulação chega ao tecido ósseo e ao fígado, onde células alvo são estimuladas para liberar o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). E tanto o

hormônio do crescimento quanto o IGF estão ativamente envolvidos no desenvolvimento do esqueleto, tendo papel na reparação e remodelação óssea no adulto (SWENSON & REECE, 1993; LIEBERMAN, 2002). Existem dois IGF identificados, IGF-1 e IGF-2, sendo que IGF-2 é o fator de crescimento mais abundante no osso e tem-se mostrado mais potente na reparação de fraturas em estudos realizados em humanos e ratos (LIEBERMAN, 2002).

Quando há deficiência de hormônio do crescimento ou hipopituitarismo, o aumento no comprimento ósseo após a ovariectomia não ocorre porque a somatostatina é necessária para estimular a proliferação de células na placa de crescimento. A somatostatina restaura o crescimento em resposta à deficiência de estrógeno. Por outro lado, nos machos o crescimento dos membros é simultaneamente dependente de testosterona e da hipófise intacta, porque o hipopituitarismo é associado à falha no crescimento em resposta a testosterona, sendo que essa falha na resposta não é reversível pela administração de hormônio do crescimento (SEEMAN, 1999).

Além dos fatores citados existem muitos outros que agem direta e indiretamente no metabolismo ósseo: fatores genéticos, fatores de crescimento e citocinas, entre outros (Quadro 1).

As citocinas consideradas ativas, mais freqüentemente, como promotoras de reabsorção são a IL-1, TNF e IL-6. Ressaltando que os efeitos destas citocinas dependem de sua concentração, como a IL-1, por exemplo, que estando em média e alta concentração desencadeia reabsorção, mas em baixas concentrações induz a formação óssea. Essas situações também são influenciadas por citocinas inibitórias, ou seja, um receptor IL-1 antagonista pode se ligar aos receptores IL-1 ou TNF, bloqueando a ligação da citocina e sua atividade (BAKER, 2000).

Quadro 1. Fatores relacionados com a formação e reabsorção óssea.

Fator	Secretado por	Ação no osso
IL-1	MØ (macrófagos), exceto linfócitos T e eritrócitos	Alta concentração: aumenta o nº de osteoclastos por fusão do precursor; inibe a síntese de colágeno
TNF-a	MØ, células T e NK	Bloqueia formação óssea: inibe síntese de colágeno, estimula reabsorção pela indução de liberação de osteoblasto de PGE ₂ e M-CSF
TNF- b (linfotóxina)	Linfócitos	Bloqueia formação óssea: inibe síntese de colágeno; estimula reabsorção com PGE ₂ : liberação de Ca, aumenta efeito da IL-1
IL-6	Células T, fibroblastos gengivais, osteoblastos se estimulados com IL-1 ou TNF	Aumenta o número de osteoclastos
PGE ₂	Monócitos, MØ, osteoblastos se estimulados com IL-1, TNF, TGF-α ou β	Promove fusão de osteoclasto; bloqueia formação óssea
1,25 dihidroxi vitamina D ₃	Monócitos, MØ	Promove fusão de progenitores de osteoclastos, diferenciação de osteoclastos
Oxigênio reativo intermediário (ROI)	Neutrófilos, MØ, osteoclastos	Formação e ativação de osteoclastos
Óxido nítrico (NO)	MØ com LPS, IL-1, TNF ou IFG	Altas quantidades: estimula reabsorção e inibe proliferação de osteoblastos
IL-8	MØ	Quimiotático para neutrófilos; promove secreção de IL-1 β e TNF- α pelos neutrófilos
IL-3	Células T CD4+ (Th1 e Th2), células NK e mastócitos	Promove diferenciação das células tronco da medula óssea em linhagem de MØ, então CSF-1 pode induzir osteoclastos
RANK-ligante	Células T e osteoblastos	Promove diferenciação de osteoclastos
IFG	Células Th1, células Tc, células NK	In vivo: promove reabsorção; aumenta efeitos na IL-1 ou inibe TNF da matriz em formação

Adaptado de: BAKER, P. J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease; p.1183, 2000.

3.4- Osteoporose

3.4.1 - Conceito e classificação

A osteoporose é uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do esqueleto, levando a acentuada fragilidade óssea e conseqüente aumento do risco de fraturas (WHO, 1999). Esta doença pode se desenvolver quando há um desequilíbrio na remodelação óssea em favor da reabsorção, resultando em perda acumulativa de massa óssea e enfraquecimento do esqueleto (BONE et al., 1997).

Em anos passados, estudos realizados com famílias e gêmeos mostraram que essa doença possui forte componente genético que tem papel importante na regulação da densidade mineral óssea (BMD). Enquanto em algumas condições isoladas a osteoporose pode ser vista como padrão hereditário Mendeliano, devido a mutações genéticas simples, na maioria dos casos tem sido considerada doença poligênica multifatorial na qual os determinantes genéticos são modulados por fatores hormonais, ambientais e nutricionais (GENNARI et al., 2002).

Esta doença é classificada, segundo a causa determinante, em primária e secundária, sendo que a primária é subdividida em tipo I e II (COHEN & ROE, 2000; GALI, 2001). A primária do tipo I é caracterizada pela perda de massa óssea, microfraturas em tecido ósseo esponjoso e fraturas em vértebras lombares. A osteoporose primária do tipo II resulta em afinamento de trabéculas e perda de tecido ósseo cortical e esponjoso (GENNARI et al., 2002; RIGGS et al., 2002). E em raras circunstâncias, a osteoporose ocorre em adultos jovens, homens e mulheres, sendo considerada sob o ponto de vista clínico como idiopática (GENNARI et al., 2002). No Quadro 2 encontram-se os diferentes tipos de osteoporose e as causas relacionadas.

Quadro 2. Classificação da Osteoporose.

OSTEOPOROSE	ORIGEM
PRIMÁRIA - TIPO I (Idiopática pós-menopausa)	Período inicial após a menopausa. Associada a deficiência de estrógenos.
PRIMÁRIA - TIPO II (Idiopática senil)	Associada ao envelhecimento, fase em que ocorre deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do PTH e diminuição de formação óssea.
SECUNDÁRIA	Associada a processos inflamatórios; alterações endócrinas; por uso de drogas (heparina, glicocorticóides, entre outros).

Adaptado de GALI, J. C. **Osteoporose**. Revista Acta Ortopédica Brasileira, volume 9, p. 53-62, 2001.

3.4.2 - Epidemiologia

A osteoporose leva ao enfraquecimento dos ossos, tornando-os mais vulneráveis a traumas, sendo considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade na terceira idade (GILSANZ, 1998). Esta alteração no metabolismo ósseo apresenta-se de maneira assintomática, lenta e progressiva. E seu caráter silencioso leva a um diagnóstico tardio, quando já existem riscos significativos de fraturas (GALI, 2001).

Atualmente considera-se a osteoporose como um dos maiores e mais preocupantes problemas de saúde do mundo. Estima-se que nos EUA, no mínimo 90% de todas as fraturas de quadril e vertebrais em mulheres idosas de raça branca e mais de 70% destas em homens idosos de raça branca são devidas à osteoporose. O risco de fraturas em mulheres de 50 anos é devido a 16% de fraturas de quadril, 15% de fraturas de pulso (radio) e 32% de fraturas vertebrais. Aproximadamente, 50% das mulheres vão ter osteoporose quando atingirem 80 anos de idade, enquanto que, um homem de 50 anos de idade, tem 6% de risco de sofrer fratura de quadril e 16 a 25% de sofrer alguma fratura osteoporótica durante a sua vida (GENNARI et al., 2002).

Com o aumento da expectativa de vida observada no último século, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, a incidência e a prevalência da osteoporose e o seu custo para a sociedade estão aumentando consideravelmente tanto para mulheres quanto para homens (OTT, 1998; JUNQUEIRA et al., 2000; GENNARI et al., 2002). Isto, considerando que a incidência das fraturas de quadril cresce exponencialmente tanto em mulheres quanto em homens idosos (WANG et al., 2001) e que os custos estimados para o tratamento destas fraturas dobrarão durante os próximos vinte e cinco anos (GENNARI et al., 2002).

As fraturas osteoporóticas representam o aspecto clínico mais relevante da osteoporose afetando todo o esqueleto, exceto o crânio. As fraturas mais comuns são nas regiões do fêmur proximal, radio distal e vértebras lombares. As fraturas de vértebras e radio têm pouca significância econômica, mas apresentam morbidade significativa. É importante ressaltar que as fraturas vertebrais são na maioria assintomáticas, dificultando a avaliação clínica (GENNARI et al., 2002).

De acordo com Enriori & Enriori (2002), 55% das mulheres entre 50 e 59 anos de idade têm BMD reduzida, sendo que esse número cresce para 69 a 88% para as mulheres entre 60 e 70 anos. Muitos fatores são associados a BMD: menopausa precoce; período da vida reprodutiva e paridade; mulheres jovens com amenorréia ou distúrbios ovulatórios, entre outros.

Considerando que os ossos dos machos são maiores que os das fêmeas, conclui-se que isto deve contribuir para a maior resistência e o menor risco de fraturas observados nos machos (SEEMAN, 1999; GENNARI et al., 2002). E, no entanto, segundo SEEMAN (1999), um terço das fraturas de quadril ocorrem nos homens idosos, o que, segundo ele pode ser devido ao aumento e severidade das quedas ou da fragilidade óssea. Epidemiologicamente, as bases morfológicas para o aumento da fragilidade óssea devem ser o resultado de várias quedas durante o crescimento ou perda óssea relacionada à idade, ou ambos.

As fraturas osteoporóticas parecem ser a causa mais importante de hospitalização, perda de independência e morte em homens e mulheres idosos (ENRIORI & ENRIORI, 2002). Fraturas vertebrais ocorrem mais cedo no homem e a mortalidade, depois da fratura de quadril ou das vértebras lombares, é também mais freqüente que nas mulheres (SEEMAN, 1999; ENRIORI & ENRIORI, 2002).

No Brasil, cerca de 10 milhões de pessoas são atingidas pela osteoporose, com a ocorrência de 80.000 casos anuais de fratura de quadril. Estima-se que em 2025, a população incluída na faixa etária acima de 60 anos de idade será de 34 milhões de pessoas, ou seja, aproximadamente 13,8% da população total brasileira poderá apresentar osteoporose (LEDERMAN & CARNEIRO, 1996).

A mortalidade depois da fratura de quadril é maior no homem do que na mulher e está relacionada à presença de co-morbidade. Estudos baseados em várias populações sugerem que a prevalência de fratura vertebral idade-específica é similar em homens e mulheres. Entretanto, as fraturas nos homens durante a maturidade estão mais relacionadas a traumas do que a fragilidade óssea. Isto se confirma porque a prevalência de fratura vertebral idade-específica é menor no homem do que na mulher; o aumento na prevalência com o avanço da idade é 30% no homem e 300% na mulher (SEEMAN, 1999).

A prevenção e o tratamento da osteoporose é, portanto, da maior importância para as organizações de saúde de todos os países do mundo (GENNARI et al., 2002).

3.4.3 - Fatores de risco

Existem diferenças raciais na densidade mineral óssea e no *turnover* ósseo demonstradas pelos valores maiores de BMD em diferentes locais do esqueleto que as mulheres de raça negra tem em relação às mulheres de raça branca com a mesma idade, peso e altura, consumo de cálcio e atividade física similares. De modo que a diferença na massa óssea é associada com a maior prevalência de osteoporose em mulheres brancas do que negras. Similarmente diferentes valores de BMD têm sido observados entre populações européias e polinésias. Essas variações na incidência da osteoporose entre grupos raciais e étnicos devem estar relacionadas com fatores ambientais e com diferenças hereditárias na susceptibilidade (GENNARI et al., 2002). No Quadro 3 estão listados os principais fatores de risco para a osteoporose.

Quadro 3. Fatores de risco para osteoporose:

FATORES DE RISCO	SIGNIFICÂNCIA DOS FATORES DE RISCO
Mapa Genético	Forte componente genético no pico de massa e menos aparente na fase de menopausa
Exercício	Formação óssea advinda de exercícios vigorosos e perda óssea por imobilização; tecido ósseo saudável não é significativamente afetado por exercícios regulares moderados
Idade à Menarca	Maior pico de massa óssea associado com menarca precoce não confirmada; menarca tardia relacionada com efeito adverso no estado ósseo após a menopausa
Idade à Menopausa	Redução da densidade óssea na mulher após a menopausa significativamente correlacionada com os anos em que está em menopausa e não com a idade em que entrou na menopausa
Período em que está na Menopausa	Idade à menopausa e período em que está na menopausa são determinantes de perda óssea tornando-se mais aparente com a passagem do tempo
Tipo de Menopausa	Ovariectomia é geralmente associada como fator de risco osteoporótico, embora não confirmado; tipo de menopausa não afeta o estado ósseo subsequente
Período de vida reprodutiva	Duração entre o período de menarca e menopausa com efeito mínimo na densidade óssea subsequente
Paridade	Gravidez não tem efeito a longo termo aparente na densidade óssea
Álcool	As observações são conflitantes do efeito na densidade óssea; beber socialmente pode ter efeitos adversos modestos; consumidores de álcool apresentam mais de 24 horas de excreção urinária de cálcio e baixa concentração de fosfatase alcalina plasmática quando comparados com não consumidores; álcool pode atuar como depressor da formação óssea e aumentar o cálcio urinário
Tabagismo	Efeitos adversos marginais na densidade óssea, como por exemplo pode reduzir a absorção de cálcio; menores efeitos do que os observados no consumo de álcool, mas a combinação de álcool e tabagismo provavelmente é a mais significativa
Peso corporal	Relacionado a massa óssea pelo fator comum de tamanho dos ossos; relação entre peso corporal e densidade óssea é evidente somente após a menopausa; mais devido ao efeito de perda óssea que ao pico de densidade óssea
Consumo de Ca	Deficiência de cálcio causa osteoporose em animais e suplementação de cálcio pode retardar a perda óssea nas mulheres após a menopausa; ainda não se comprovou a relação entre consumo de cálcio (na dieta) e estado ósseo nas mulheres após a menopausa
Absorção de Ca	Absorção de cálcio relacionada inversamente ao consumo de cálcio em indivíduos normais mas não com osteoporose; declínio na absorção de cálcio com severidade progressiva na osteoporose
Excreção urinária de Ca	Aumento na concentração urinária cálcio/creatinina matinal (marcador de perda de cálcio) como consequência da progressão da osteoporose; excreção de cálcio é um dos maiores fatores de risco para compressão vertebral
Albumina plasmática	Declínio relacionado à idade, sendo mais marcante na osteoporose primária tipo I
Sulfato dihidroepiandrosterona sérica (DHAS)	Declínio relacionado à idade, sendo mais marcante na osteoporose primária tipo I
Espessura da pele	Pico de redução na osteoporose primária tipo I

Adaptado de Nordin et al. Bad habits and bad bones. In Nutritional Aspects of Osteoporosis. Challenges of Modern Medicine, v. 7, p. 1-25, 1995

3.4.4 Fisiopatologia da osteoporose

A maior alteração patológica observada em grande parte dos casos de osteoporose inclui o aumento de porosidade na cortical da diáfise e afinamento das trabéculas ósseas. Essa alteração é controlada pela remodelação óssea, sendo esta por sua vez realizada pelas BMUs. A intensidade da perda óssea depende da relação entre formação e reabsorção óssea, podendo ocorrer um aumento, concomitantemente, tanto na formação quanto na reabsorção óssea, ou formação normal e reabsorção óssea aumentada, ou reabsorção normal e formação óssea diminuída (DEMPSTER et al., 1995; OTT, 1998; ABE et al., 1999; HARADA & RODAN, 2003).

Os princípios da regeneração óssea fisiológica e do papel dos osteoblastos e osteoclastos neste processo torna-se óbvio que a reposição dessas células e o tempo decorrido para morte por apoptose são determinantes críticos para o desenvolvimento de novas BMUs. No caso da patogênese das várias formas de osteoporose a reposição ou não dessas células é um problema fundamental para a remodelação que ocorre na osteoporose (MANOLAGAS, 2000).

Segundo o mesmo autor, de acordo com a origem da perda óssea ocorrem diferentes alterações celulares relacionadas principalmente com osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e em menor proporção com adipócitos conforme Quadro 4.

Quadro 4. Alterações celulares relacionadas às três causas mais comuns de perda óssea.

OSTEOPOROSE	ALTERAÇÕES CELULARES
DEFICIÊNCIA DE ESTERÓIDES SEXUAIS	↑ osteoblastogenese ↑ osteoclastogenese ↑ período de vida dos osteoclastos ↓ período de vida dos osteoblastos ↓ período de vida dos osteócitos
ENVELHECIMENTO	↓ osteoblastogenese ↓ osteoclastogenese ↑ adipogenese ↓ período de vida de osteócitos
EXCESSO DE GLICOCORTICÓIDES	↓ osteoblastogenese ↓ osteoclastogenese ↑ adipogenese ↑ período de vida de osteoclastos ↓ período de vida de osteoblastos ↓ período de vida de osteócitos

Adaptado de MANOLAGAS, S. C. Birth And Death Of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms And Implications For The Pathogenesis And Treatment Of Osteoporosis. Endocrine Reviews. v. 21, n.2.;p. 115–137, 2000.

3.4.4.1 - Fatores que afetam a atividade dos osteoclastos

A atividade dos osteoclastos pode ser aumentada pela deficiência de estrógenos, corticosteróides (HULLEY et al., 2002; HARADA & RODAN, 2003), acidose e metabólitos de vitamina D. Já a atividade dos osteoclastos é reduzida pela calcitonina e bifosfonatos (OTT, 1998).

3.4.4.2 - Fatores que afetam a atividade dos osteoblastos

Com o envelhecimento, os osteoblastos não conseguem completar os espaços reabsorvidos, provavelmente pelo número insuficiente destes (OTT, 1998). Estudos *in vivo* que foram conduzidos em ratos mostraram que o tratamento diário com PTH aumenta o número de osteoblastos e sua atividade, provavelmente sem estimular a proliferação de osteoblastos (SATO et al., 2002). A atividade dos osteoblastos pode ser aumentada também pelos fatores de crescimento como TGF- β (fator de crescimento transformante- β), e deprimida por corticosteróides, bilirrubina e intoxicações com alumínio (OTT, 1998).

3.4.5 - Alterações plasmáticas e no tecido ósseo

A porção dos principais elementos estruturais do tecido ósseo, cálcio e fosfato, que se encontra na parte trabecular dos ossos está em equilíbrio dinâmico com aqueles dos fluidos corporais e outros tecidos do corpo. Nos períodos de deficiência, o cálcio e o fosfato são mobilizados dos ossos para manter os níveis normais no sangue e outros tecidos moles. Normalmente, o plasma contém 9 a 11 mg/dl de cálcio para a maioria das espécies, sendo que 45 a 50% está na forma ionizada e 40 a 45% está ligado às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. Os 5% restantes estão complexados com elementos não-ionizados, dependendo do pH do sangue. A proporção plasmática de 1:1 ou 2:1 de cálcio e fósforo é indicada para que ocorra uma boa absorção intestinal do cálcio, sendo que qualquer desequilíbrio na homeostasia deste constituinte altera os níveis normais dos hormônios calciotrópicos tendo como consequência direta sua mobilização do tecido ósseo, considerando que a concentração óssea adequada destes minerais é de 2:1 (SWENSON & REECE, 1993).

Em estudo experimental de deficiência de cálcio em vertebrados adultos, não houve hipocalcemia significativa, mas indução de reabsorção óssea mediada por PTH. O organismo demonstra preferência na manutenção da concentração de cálcio plasmático em relação a preservação da integridade do esqueleto, presumivelmente para proteger o sistema neuromuscular e outros processos dependentes de cálcio. Então, nos estados de deficiência crônica de cálcio, o balanço negativo e a mobilização de cálcio do esqueleto são contínuas e desencadeiam mais cedo ou mais tarde a condição de osteoporose, ou seja, redução da densidade óssea (NORDIN, 1996).

A matriz colagenosa é depositada pelos osteoblastos e na seqüência é mineralizada. Se a mineralização for inibida, o indivíduo vai desenvolver osteomalácia, que pode mimetizar a osteoporose, apresentando níveis inadequados de cálcio ou fosfato. Sendo que o tratamento com bifosfonatos pode induzir um aumento de mineralização resultando em um aumento da densidade óssea, continuando o osso no entanto, poroso (OTT, 1998).

3.4.6 - Alterações biomecânicas

3.4.6.1 - Estrutura óssea e resistência

O cálcio é um nutriente essencial que está envolvido na maioria dos processos metabólicos e nos sais de fosfatos dos quais provém a rigidez mecânica para os ossos e dentes, onde se deposita 99% do cálcio total. Os efeitos da deficiência de cálcio e ovariectomia são aditivos. Em humanos, a perda óssea começa na menopausa para mulheres e aproximadamente aos 55 anos para os homens, sendo que no caso das mulheres as alterações no metabolismo do cálcio são a causa ou o resultado da perda óssea após a menopausa (NORDIN, 1997). Ainda com relação à menopausa, no período inicial, ocorre um declínio exponencial de tecido ósseo sendo que aproximadamente 20 a 30% é de osso trabecular e em torno de 10% de osso cortical (RIGGS et al., 2002)

Na osteoporose secundária e primária do tipo II, nos homens, a depressão na formação óssea é provavelmente um fator crítico. Considerando-se a associação da má absorção de cálcio e/ou alta excreção deste na osteoporose estabelecida, entende-se que um balanço negativo de cálcio é no mínimo um fator contribuinte senão o fator fundamental para a maioria das formas de osteoporose no homem (NORDIN, 1997).

A massa óssea é um dos fatores determinantes da resistência mecânica óssea, embora justifique somente 30 a 40% da variabilidade desta característica. Outros fatores estão envolvidos na determinação da qualidade do tecido ósseo, sendo que dentre estes estão o grau de mineralização, o *turnover* ósseo e a microarquitetura deste tecido. Por exemplo, o volume de medula óssea tem influência inversamente proporcional à conectividade trabecular, ou seja, quanto maior o volume medular, menor a conectividade e conseqüentemente menor a resistência deste tecido (CORTET & MARCHANDISE, 2001).

Em adição à porosidade, a resistência óssea é determinada pela microestrutura trabecular. “Perfurações” de trabéculas individuais ocorrem quando as cavidades reabsorvidas estão muito profundas, sendo este tipo de alteração observada no caso de deficiência de estrógeno. As trabéculas remanescentes não são bem conectadas às outras e são mecanicamente frágeis. A restauração

de microfraturas é outro aspecto de resistência óssea que não é mensurado pela densidade óssea. As trabéculas ósseas sofrem fraturas e são formados microcalos como aqueles vistos em reparação de macrofraturas em ossos longos. O osso osteoporótico é mais suscetível a esse tipo de fraturas porque as trabéculas, individualmente, não têm conexões muito reforçadas. Esses calos que se formam após a fratura representam um método de reparação óssea. Quando os ossos perdem a capacidade de formar esses calos, se tornarão frágeis (OTT, 1998).

3.5 - Modelos animais

A diretriz para avaliação pré-clínica e clínica de agentes usados na prevenção ou no tratamento da osteoporose pós-menopausa proposta por THOMPSON et al. (1995), recomenda modelos animais específicos para avaliação dos novos agentes em potencial para terapêutica da osteoporose. Considerando que estudos realizados reconhecem que não há modelo animal que imite precisamente as condições humanas de osteoporose (THOMPSON et al., 1995; THORNDIKE & TURNER, 1998), uma condição essencial é que os modelos animais escolhidos possam fornecer informação sobre a qualidade e estrutura óssea que não seria obtida em pacientes de triagem clínica. Os modelos animais de osteoporose são, portanto, agentes imprescindíveis para se obter uma mensuração eficaz e segura da qualidade óssea (THOMPSON et al., 1995).

O esqueleto do rato adulto tem muitas similaridades com o esqueleto humano. Os ossos longos de ambas as espécies alongam pelo crescimento epifiseal (ossificação endocondral) e aumentam sua seção transversal pelo crescimento periosteal (ossificação intramembranosa secundária). Nos ratos adultos, o crescimento radial ocorre em graus ínfimos e a ossificação esponjosa secundária ocorre como remodelação seqüencial similar àquela observada no tecido ósseo esponjoso em humanos (MARTIN et al., 2003).

Uma das grandes vantagens no uso de roedores para estudos genéticos é a viabilidade dos ossos para mensuração direta de propriedades biomecânicas incluindo resistência e fragilidade. Propriedades biomecânicas fundamentais

incluem força de fratura (mensuração de resistência), firmeza (inflexibilidade) e trabalho para fratura (mensuração da fragilidade óssea). E os ratos, tanto machos como fêmeas, têm sido utilizados como modelo padrão para o estudo biomecânico do esqueleto (JÄMSÄ et al., 1998). As propriedades biomecânicas podem ser avaliadas em vários locais incluindo diáfise, colo femoral e vértebra (PEACOCK et al., 2002).

No caso da osteoporose pós-menopausa, o modelo animal mais utilizado para estudar as conseqüências de perda óssea na estrutura e resistência óssea ou para validar estratégias terapêuticas é o de rata ovariectomizada (BAGI et al., 1997), existindo uma extensa literatura a respeito da fisiologia e da biologia do esqueleto desta espécie (THOMPSON et al., 1995) e de alterações histomorfométricas, marcadores bioquímicos, metodologia para densitometria óssea, fragilidade óssea, entre outros (THORNDIKE & TURNER, 1998).

WANG et al. (2001) sugerem utilizar ratos adultos intactos (não castrados) para estudar a perda óssea relacionada com a idade no homem, porque o homem não apresenta a perda abrupta de hormônios sexuais com o envelhecimento, embora uma deficiência gonadal possa causar osteopenia tanto em homens como em ratos.

Enfim, essa espécie é utilizada como modelo animal para doenças humanas porque é fácil de obter, tem baixo custo e é apropriada para o estudo da perda óssea devido ao curto período de vida (WANG et al., 2001; MARTIN et al., 2003). Com relação ao uso do rato como modelo animal para o estudo da perda óssea relacionada à idade no homem a motivação é também devido ao extenso conhecimento que se tem sobre os machos desta espécie (WANG et al., 2001).

Por outro lado, os ratos pertencem a uma espécie que apresenta pouca similaridade com os humanos em relação à remodelação Haversiana, ou seja, quando crescem em condições normais não apresentam remodelação Haversiana secundária de osso cortical (SIETSEMA, 1995; ORTOFT & OXLUND; 1996; MARTIN et al., 2003), mas pode se observar um aumento na fragilidade dos ossos longos, após terapia com glicocorticóides, através de testes biomecânicos (ORTOFT & OXLUND, 1996).

No caso de ratas ovariectomizadas e avaliadas após três meses de perda óssea, quanto à porosidade cortical, não apresentam diferença significativa quando comparadas com as ratas inteiras ou não castradas (SIETSEMA, 1995). Como efeitos imediatos da ovariectomia no esqueleto das ratas, os resultados dos estudos de THOMPSON et al. (1995), indicaram que o modelo mimetiza a perda de tecido ósseo esponjoso que ocorre após a menopausa. Estas observações mostraram que o *turnover* do tecido ósseo esponjoso aumenta como consequência da ovariectomia e que este aumento produz perda óssea. O estrógeno bloqueia o *turnover* e a perda óssea. Então, esta avaliação sugere que o modelo de rata ovariectomizada mimetiza as condições da tíbia proximal, fêmur distal e vértebra lombar na mulher após a menopausa e é adequado para avaliação do potencial terapêutico de agentes para a osteoporose.

Nas ratas castradas a tíbia proximal e a vértebra lombar, por exemplo, respondem similarmente à deficiência de estrógeno como mensurado pela perda de osso trabecular e resposta positiva ao tratamento com estrógeno. É importante que a ovariectomia tenha sido realizada entre 6 meses a 1 ano, porque após este período os efeitos do aumento do tamanho do esqueleto nos ossos cortical e esponjoso começam a ficar obscuros (THOMPSON et al., 1995). Os autores sugerem restringir os estudos de indução de perda óssea e uso de agentes terapêuticos em modelos de ratas por um período inferior a 6 meses após a ovariectomia (THOMPSON et al., 1995; TANIZAWA et al., 2000).

Segundo estudo realizado por DEMPSTER et al. (1995), as ratas apresentam um aumento no *turnover* ósseo após a ovariectomia que é evidenciado pelo aumento de osteoclastos na superfície óssea (400%) e pelo grau de formação óssea (270%). O decréscimo no volume de osso esponjoso que ocorre na seqüência é tempo-dependente e altamente relacionado à redução do número de lamelas trabeculares e parâmetros de conectividade, mas não é relacionado com a espessura de placas esponjosas remanescentes. Os resultados obtidos sugerem que a perda de osso esponjoso devido à deficiência de estrógeno é o resultado do decréscimo de conectividade, provavelmente

devido à “perfuração” das lamelas trabeculares realizada pelos osteoclastos, seguida pela completa remoção da lamela sem um prévio afinamento generalizado.

4- MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do experimento foram utilizados 192 ratos (*Rattus norvegicus*), adultos (96 machos e 96 fêmeas) oriundos do Biotério da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O experimento foi conduzido no Laboratório Biofármacos/UFV em uma sala devidamente climatizada com controle de temperatura (20 - 24°C), umidade relativa do ar (45 – 70%) e fotoperíodo de 12 horas. Os animais permaneceram nesta sala durante uma semana em ambientação.

4.1 - Distribuição dos Grupos

Os animais foram divididos em oito grupos, com 24 animais em cada (Quadro 5):

Quadro 5. Distribuição dos grupos experimentais nas diferentes coletas.

Coleta Animais	1ª Coleta (14 Dias)	2ª Coleta (28 Dias)	3ª Coleta (42 Dias)	4ª Coleta (56 Dias)	Total de Animais/ Grupo
Grupo I Machos controle	6	6	6	6	24
Grupo II Machos castrados	6	6	6	6	24
Grupo III Machos + glicocorticóide	6	6	6	6	24
Grupo IV Machos castrados + glicocorticóide	6	6	6	6	24
Grupo V Fêmeas controle	6	6	6	6	24
Grupo VI Fêmeas castradas	6	6	6	6	24
Grupo VII Fêmeas + glicocorticóide	6	6	6	6	24
Grupo VIII Fêmeas castradas + glicocorticóide	6	6	6	6	24
Total de Animais/Coleta	48	48	48	48	192

O experimento foi conduzido em gaiolas com seis ratos em cada. A cama utilizada foi de maravalha estéril (autoclavada). As gaiolas foram lavadas de 2 a 3 vezes por semana e a cama substituída. Os animais receberam ração comercial (Labina-Purina) e água *ad libitum*.

4.2 - Procedimento cirúrgico

Uma semana após a chegada, os animais dos grupos II, IV, VI e VIII foram submetidos à castração, a qual foi realizada sob anestesia geral com tiletamina-zolazepam*¹, na dose de 30 mg/kg de peso vivo, via intramuscular.

Nas fêmeas, após a incisão retroumbilical da pele e subcutâneo, foi incisada a linha alba, fazendo-se acesso à cavidade abdominal. Foram realizadas duas ligaduras, uma em cada pedículo ovariano com fio de

*¹ ZOLETIL® 50 – Virbac

algodão nº 10-0 e estes foram seccionados. Foram realizadas duas linhas de sutura com fio não absorvível (nylon nº 0,25) peritônio e musculatura; tecido subcutâneo e pele.

Nos machos, o testículo foi empurrado até a incisão cutânea escrotal e, em seguida efetuou-se a incisão da fáscia espermática e ligamento escrotal para exteriorizá-lo e liberá-lo de suas inserções escrotais. O cordão espermático foi mantido intacto e as túnicas vaginais receberam dupla ligadura. O cordão espermático foi transeccionado e retornado à região inguinal. Realizou-se o mesmo procedimento no outro testículo. A sutura da pele e tecido subcutâneo foi realizada com fio não absorvível (nylon nº 0,25).

Imediatamente após o ato cirúrgico, todos os animais receberam antibiótico*² na dosagem de 5g/kg por via intramuscular, que foi repetida por mais dois dias consecutivos.

4.3 - Administração de Glicocorticóide

Aos 15 dias após o procedimento cirúrgico os animais dos grupos IV e VIII receberam uma dose de 7 mg/kg de dexametazona*³ por semana, via intramuscular, durante quatro semanas. Os animais dos grupos III e VII também receberam o mesmo tratamento.

4.4 - Coleta de Material para Análises

As coletas foram realizadas em todos os grupos aos 14, 28, 42 e 56 dias após o início da administração do glicocorticóide.

Após a coleta do sangue os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico. Em seguida realizou-se a necropsia e as tíbias esquerdas, úmeros direitos e as vértebras lombares L5 foram coletados.

*² Oxitrat-La[®] - Vallée

*³ Azium[®] - Schering-Plough

4.4.1 - Bioquímica do Plasma

Os animais foram sedados por inalação com éter etílico para coleta de sangue que foi realizada com seringa de 5 ml, agulha nº 25x7, sendo o material acondicionado em tubos de ensaio estéreis contendo heparina sódica^{*4}. Logo a seguir as amostras foram centrifugadas a 7.100 xg por 15 minutos a temperatura ambiente. O plasma foi recolhido e mantido em geladeira a 6^o C.

Para determinar as concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e proteínas totais foi usado um analisador multiparamétrico de bioquímica^{*5}, além de kits específicos^{*6}.

4.4.3 - Bioquímica Óssea

Os ossos coletados foram desengordurados^{*7} utilizando-se o éter etílico como solvente. Após a retirada da gordura, os ossos foram mantidos em dessecador com sílica até o momento da análise do cálcio, fósforo e magnésio.

Os úmeros depositados individualmente em cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a uma temperatura de 600°C durante quatro horas e conservados em dessecador por uma hora. A dissociação dos minerais dos ossos foi obtida com ácido clorídrico 1:1 em chapa de aquecimento (banho de areia), e essa solução foi diluída em água destilada e desionizada até completar um volume de 100ml.

A análise quantitativa do cálcio e magnésio foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica por chama^{*8} e para análise do fósforo um espectrofotômetro de calorimetria/fotometria^{*9}.

*4 Liquemine® - Roche

*5 Alizé – modelo Lisabio nº b-652

*6 Biomerieux®

*7 aparelho Marconi – modelo MA 490

*8 modelo GBC AVANTA Σ

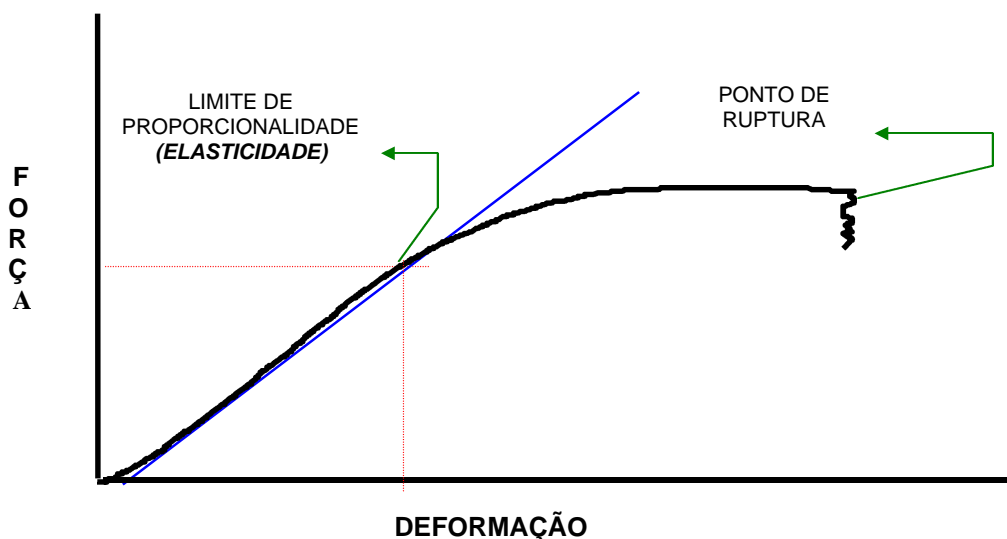
*9 modelo U-2000

4.4.4 - Teste Biomecânico

As análises foram realizadas nas tíbias esquerdas e vértebras L5 em laboratório climatizado (umidade: $50\% \pm 2\%$; temperatura: $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) com equipamento do tipo Instron*¹⁰, sendo que a velocidade de teste foi de 25 mm/min e capacidade da célula de carga de 100 Kgf.

Para os testes de flexão, as tíbias foram apoiadas em um suporte com 30 mm de distância entre seus dois pontos de apoio e flexionados com aplicação de força ao centro. Neste teste foram analisadas: força máxima no ponto de ruptura, deformação máxima no ponto de ruptura, força no limite de proporcionalidade, deformação no limite de proporcionalidade, tenacidade, resiliência e rigidez. Na Figura 1 observam-se os parâmetros analisados de acordo com a deformação à qual o osso é submetido em função da força aplicada.

Figura 1. Exemplo das relações de Força X Deformação produzidas nas tíbias esquerdas e vértebras L5 nos testes de flexão e compressão.



Para um melhor entendimento dos testes biomecânicos, foram definidos abaixo os termos utilizados para os parâmetros avaliados nestes testes.

A força até ponto de ruptura é aquela necessária para alcançar a resistência final do osso expressa em Newton ou um de seus múltiplos. A

*¹⁰ modelo 4204

deformação até o ponto de ruptura é a relação entre o tamanho inicial do osso e o alongamento máximo observado neste até a falência óssea quando submetido ao teste força aplicada.

O limite de proporcionalidade expressa a partir de que momento o osso começa a se danificar de modo irreversível em relação à força aplicada *versus* deformação.

Tenacidade é uma medida que expressa a capacidade do osso em absorver energia sob condições de aplicação de carga até sua ruptura. Resiliência é a capacidade do osso em absorver energia de forma elástica, permitindo-o retornar a sua forma anterior após a retirada da carga.

A rigidez expressa a habilidade do osso em resistir a deformações em função das tensões aplicadas.

As vértebras lombares foram polidas com lixa nº P150 nas extremidades cranial e caudal para se obter estabilidade quanto ao seu posicionamento no aparelho, os processos transversos e espinhosos foram retirados para que não oferecessem resistência no momento do teste. As propriedades mecânicas analisadas na compressão das vértebras foram: força máxima até o ponto de ruptura, deformação máxima até o ponto de ruptura, compressão, força até o limite de proporcionalidade, contração até o limite de proporcionalidade e resiliência. Sendo que a compressão é a força exercida em kN/m sobre o diâmetro do corpo vertebral até o momento de fratura.

4.5 - Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Sistema de Análises Estatísticas (SAEG/UFV). As médias obtidas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e a significância das médias pelo teste F. Para a comparação de médias entre tratamentos e entre tratamento e períodos de coleta usou-se o teste Newman Keuls, com probabilidade de erro de 5%.

5- RESULTADOS

5.1 Análise Quantitativa de Cálcio, Fósforo e Proteínas Totais no Plasma

A análise de variância das médias de concentração do cálcio plasmático não foram estatisticamente significativas nos grupos I, II, III e IV para tratamentos e períodos de coleta (Tabela 1).

Na comparação de médias de fósforo plasmático obteve-se significância estatística para tratamentos e períodos de coleta para os grupos II e III (Tabela 1, Gráfico 1).

Os grupos I, II, III e IV apresentaram na concentração de proteínas plasmáticas médias significativas entre tratamentos. Sendo que o grupo II apresentou a maior média e comportamento diferente dos outros grupos. Os grupos IV, III e I tiveram o mesmo comportamento e médias semelhantes para esta análise (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e proteínas totais nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	CÁLCIO (mg/dL) ^{ns}				FÓSFORO (mg/dL) ^{*1}				PROTEÍNAS TOTAIS (g/L) ^{*2}			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	11,88	11,24	12,49	12,38	7,71	8,13	17,80	8,28	63,50	68,73	63,90	65,38
28	12,14	11,13	11,40	11,93	7,44	19,56	17,21	9,34	68,36	68,80	68,45	66,11
42	11,51	12,40	11,96	12,90	6,77	5,52	5,90	6,07	68,16	75,58	67,80	71,90
56	12,18	12,40	12,63	12,53	6,05	4,98	5,44	6,19	68,38	71,90	69,88	69,25

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

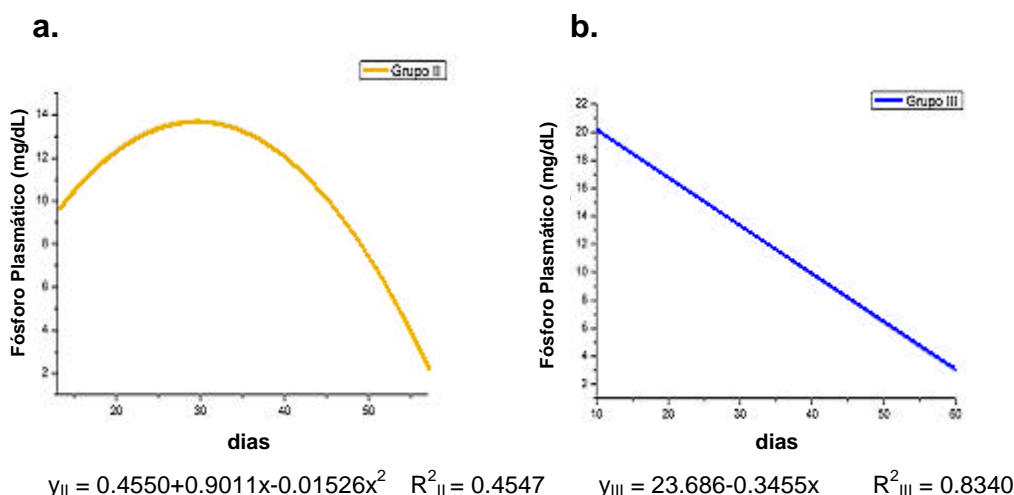


Gráfico 1. Concentrações plasmáticas médias de fósforo nas diferentes coletas dos grupos de machos II (a) e III (b).

Tabela 2. Comparação de médias entre tratamentos de proteínas plasmáticas dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (g/L)
II	71.25 ^A
IV	68.16 ^B
III	67.50 ^B
I	67.10 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 5$)

As médias de concentração de cálcio plasmático obtidas dos grupos V, VI, VII e VIII e submetidas a análise de variância foram significativas estatisticamente entre períodos de coleta (Tabela 3, Gráfico 2).

Os grupos VI, VII e VIII apresentaram concentração de fósforo com significância estatística na comparação de médias entre tratamentos e períodos de coleta (Tabela 3, Gráfico 3). Os grupos V e VII tiveram resultados estatisticamente significativos para proteínas plasmáticas (Tabela 3, Gráfico 4).

Tabela 3. Concentrações plasmáticas médias de cálcio, fósforo e proteínas totais nos grupos de fêmeas V, VI, VII, VIII.

GRUPOS COLETAS (dias)	CÁLCIO (mg/dL) ^{ns}				FÓSFORO (mg/dL) ^{*1}				PROTEÍNAS TOTAIS (g/L) ^{*2}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	12,40	12,60	12,60	13,13	7,70	11,92	6,87	12,61	63,54	61,18	68,45	63,70
28	12,35	12,37	12,00	11,80	7,77	8,29	5,54	5,12	72,70	66,56	62,45	64,20
42	11,45	11,80	12,53	12,50	6,96	6,34	12,66	11,73	65,16	65,12	71,10	70,98
56	11,33	11,88	12,25	11,29	9,91	6,08	7,13	7,11	76,05	67,46	72,11	67,45

*¹: significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*²: significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

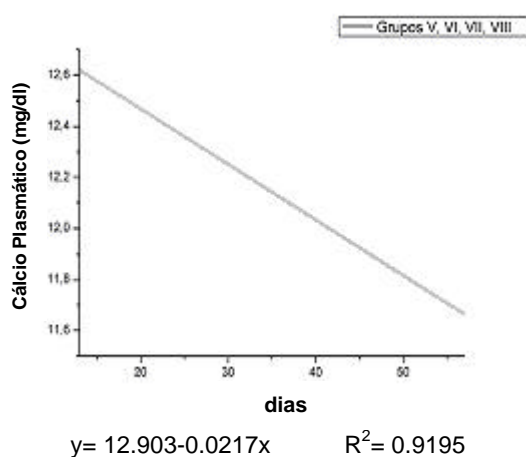


Gráfico 2. Concentrações plasmáticas médias de cálcio nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

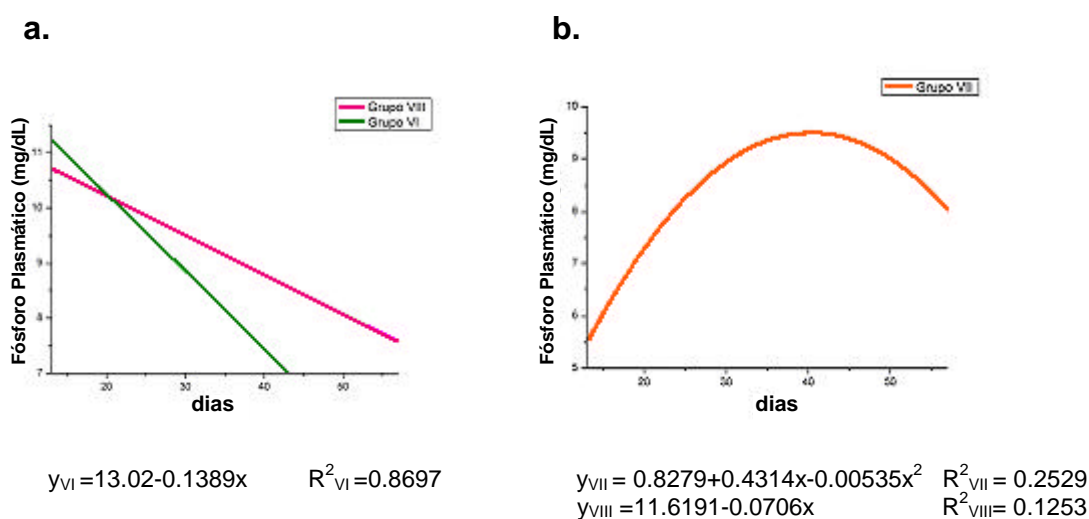
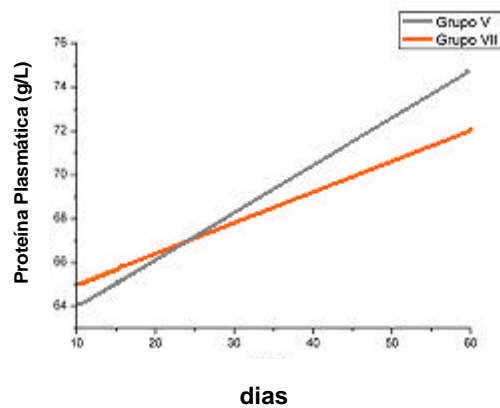


Gráfico 3. Concentrações plasmáticas médias de fósforo nos grupos de fêmeas VI (a), VII (b) e VIII (a).



$$y_V = 61.8650 + 0.2142x \quad R^2_V = 0.4190$$

$$y_{VII} = 63.6167 + 0.1403x \quad R^2_{VII} = 0.3420$$

Gráfico 4. Concentrações médias de proteínas plasmáticas nos grupos de fêmeas V e VII.

5.2 Análise Quantitativa de Cálcio, Fósforo e Magnésio no Osso

Os resultados obtidos da concentração de fósforo no osso foram significativos estatisticamente entre períodos de coleta para os grupos I, II, III e IV (Tabela 4, Gráfico 5).

A concentração de cálcio no úmero segundo teste de análise de variância (ANOVA) não foi estatisticamente significativa com relação aos diferentes tratamentos e períodos de coleta nos grupos I, II, III e IV (Tabela 4).

Na comparação de médias entre tratamentos para concentração de magnésio no osso, o grupo I apresentou a maior média e comportamento diferente dos outros grupos. Os grupos II, III e IV obtiveram médias muito próximas e comportamento semelhante com relação a concentração de magnésio no úmero (Tabelas 4 e 5).

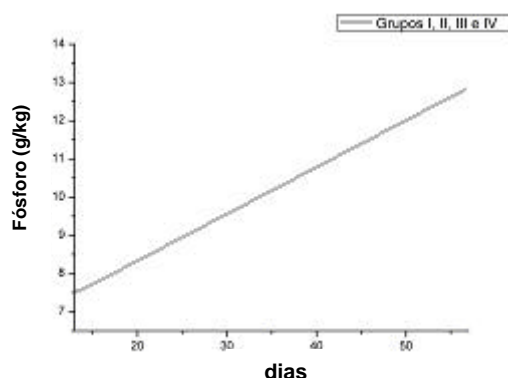
Tabela 4. Concentração média de fósforo, cálcio e magnésio do úmero nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	FÓSFORO (g/kg) ^{ns}				CÁLCIO (g/kg) ^{ns}				MAGNÉSIO (g/kg) ^{*2}			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	84,0	85,6	66,0	73,1	192,9	191,8	181,6	176,2	3,9	3,4	3,2	2,8
28	94,7	88,7	83,6	90,8	196,0	182,3	179,2	180,4	3,5	3,2	3,0	3,0
42	115,9	108,0	115,4	116,8	179,9	169,0	176,5	172,1	3,4	2,9	3,0	2,9
56	136,9	129,2	114,4	123,7	197,9	187,9	161,6	192,9	3,9	3,3	2,9	3,3

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo



$$y = 5.8901 + 0.1223x \quad R^2 = 0.9795$$

Gráfico 5. Concentração média de fósforo no úmero nos grupos de machos I, II, III e IV.

Tabela 5. Comparação de médias entre tratamentos de magnésio no osso dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (g/kg)
I	0.37 ^A
II	0.32 ^B
III	0.30 ^B
IV	0.30 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 5$)

A concentração de fósforo no osso foi significativa estatisticamente na comparação entre tratamentos, onde observou-se que o grupo VII teve comportamento diferente dos outros grupos e a maior concentração de fósforo no úmero. Os grupos VI, V e VIII obtiveram médias próximas e mesmo comportamento para esta análise (Tabelas 6 e 7).

Na comparação da concentração de cálcio no osso entre tratamentos, o grupo V apresentou a maior média e comportamento diferente dos outros grupos. Os grupos VII, VI e VIII tiveram médias próximas e mesmo comportamento com relação a concentração de cálcio no úmero (Tabelas 6 e 8).

A concentração de magnésio no úmero foi significativa estatisticamente entre tratamentos e períodos de coleta para os grupos V e VIII (Tabela 6, Gráfico 6).

Tabela 6. Concentração média de fósforo, cálcio e magnésio do úmero nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETAS (dias)	FÓSFORO (g/kg) ^{*2}				CÁLCIO (g/kg) ^{*1 *2}				MAGNÉSIO (g/kg) ^{*1}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	70,0	75,9	85,2	86,9	184,3	163,3	185,7	185,3	3,3	3,0	3,4	3,1
28	96,0	100,6	99,7	91,2	194,5	203,3	199,6	186,9	3,4	3,7	3,4	3,9
42	130,2	130,2	135,1	126,0	175,6	177,2	181,6	167,6	3,3	3,2	3,2	3,1
56	135,6	133,5	140,2	128,8	235,8	191,2	185,1	171,5	4,0	3,2	3,4	2,9

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

Tabela 7. Comparação de médias de fósforo entre tratamentos no úmero dos grupos V, VI, VII e VIII.

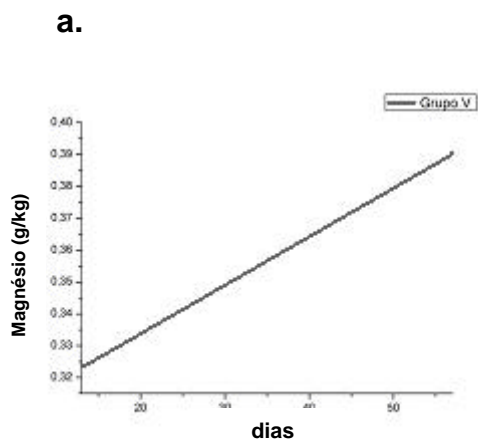
GRUPOS	MÉDIAS (g/kg)
VII	11.50 ^A
VI	10.95 ^B
V	10.89 ^B
VIII	10.82 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

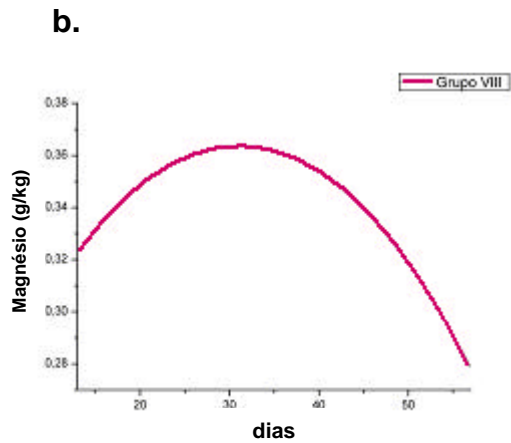
Tabela 8. Comparação de médias de cálcio entre tratamentos no úmero dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (g/kg)
VII	19.75 ^A
VI	18.80 ^B
V	18.38 ^B
VIII	17.78 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)



$$y_V = 0.3033 + 0.001528x \quad R^2_V = 0.6225$$



$$y_{VIII} = 0.2428 + 0.00781x - 0.000126x^2 \quad R^2_{VIII} = 0.6120$$

Gráfico 6. Concentração média magnésio no úmero nos grupos de fêmeas V (a) e VIII (b).

5.3 Ensaio Mecânicos

5.3.1 Ensaio Mecânico de Flexão

No ensaio mecânico de flexão realizado em tíbias se observa e comparam os valores das propriedades mecânicas dos ossos dos diferentes grupos experimentais.

Os testes biomecânicos para se obter a força máxima até o ponto de ruptura demonstraram que na comparação entre tratamentos e períodos de coleta o grupo I apresentou maior resistência para que ocorresse a fratura, ou seja, precisou se aplicar mais força para que o osso se rompesse. Enquanto que, o grupo II apresentou-se mais frágil. E o grupo IV apresentou média inferior a todos os outros grupos. O grupo III não apresentou resultados significativos (Tabela 9, Gráfico 7). Nos testes de deformação máxima até o ponto de ruptura as comparações das médias entre tratamentos e períodos de coleta foram estatisticamente significativas para os grupos I, II e IV (Tabela 9, Gráfico 8).

Tabela 9. Médias da força (FMPR) e deformação (DMPR) máximas até o ponto de ruptura obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	FMPR (N) * ¹ * ²				DMPR (mm) * ¹			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	59,04	59,73	52,18	54,25	0,99	0,83	1,11	0,82
28	62,93	50,62	52,93	39,83	1,26	1,52	1,30	1,48
42	75,78	58,94	58,76	46,17	1,33	1,01	1,06	0,95
56	68,69	62,60	57,39	46,31	1,37	1,23	1,45	1,00

*¹ : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*² : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

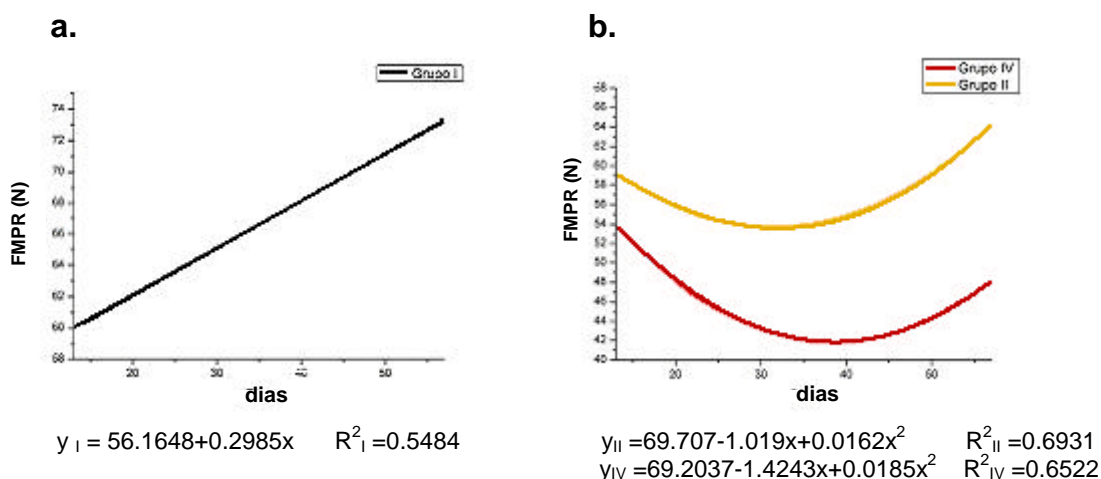


Gráfico 7. Médias de força máxima até o ponto de ruptura (FMPR) obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I (a), II e IV (b).

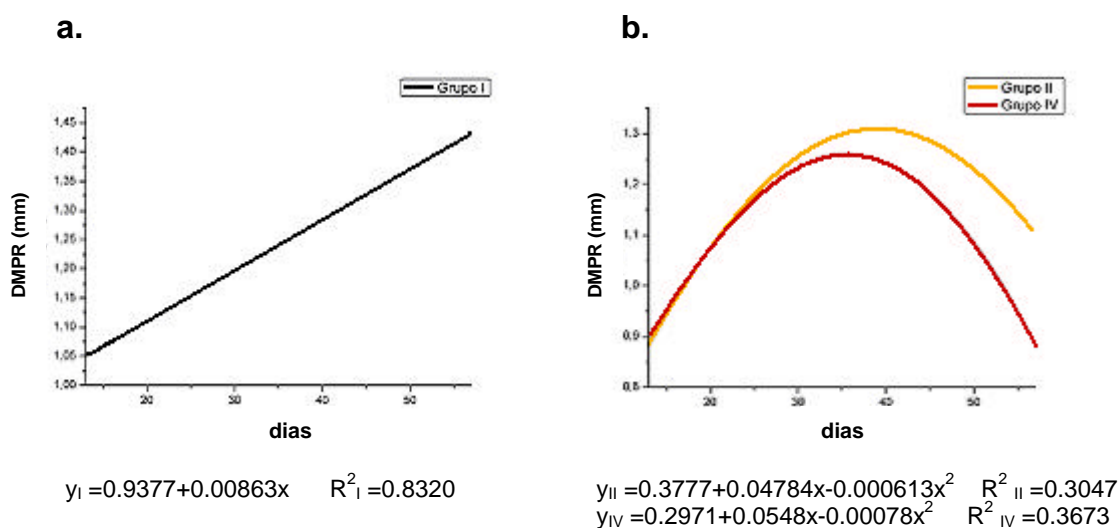


Gráfico 8. Médias de deformação máxima até o ponto de ruptura (DMPR) obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I (a), II e IV (b).

Nos testes de força até o limite de proporcionalidade, as comparações entre tratamentos e períodos de coleta demonstraram que o grupo I necessita de maior força aplicada para que haja algum dano ao osso. Na seqüência o grupo II que teve média inferior ao grupo I citado. Sendo que a média do grupo IV foi inferior a dos outros grupos e o grupo III não teve resultado significativo estatisticamente (Tabela 10, Gráfico 9). Os grupos I e IV apresentaram médias de deformação até o limite de proporcionalidade estatisticamente significativas entre tratamentos e períodos de coleta (Tabela 10, Gráfico 10).

Tabela 10. Médias da força (FLP) e deformação (DLP) até o limite de proporcionalidade obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	FLP (N) * ¹ * ²				DLP (mm) * ¹			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	42,02	47,88	38,84	45,67	0,56	0,55	0,68	0,55
28	42,07	34,13	38,34	28,32	0,65	0,78	0,64	0,84
42	52,77	42,51	41,20	31,45	0,61	0,60	0,54	0,67
56	50,21	44,97	36,16	28,87	0,79	0,67	0,68	0,46

*¹ : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*² : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

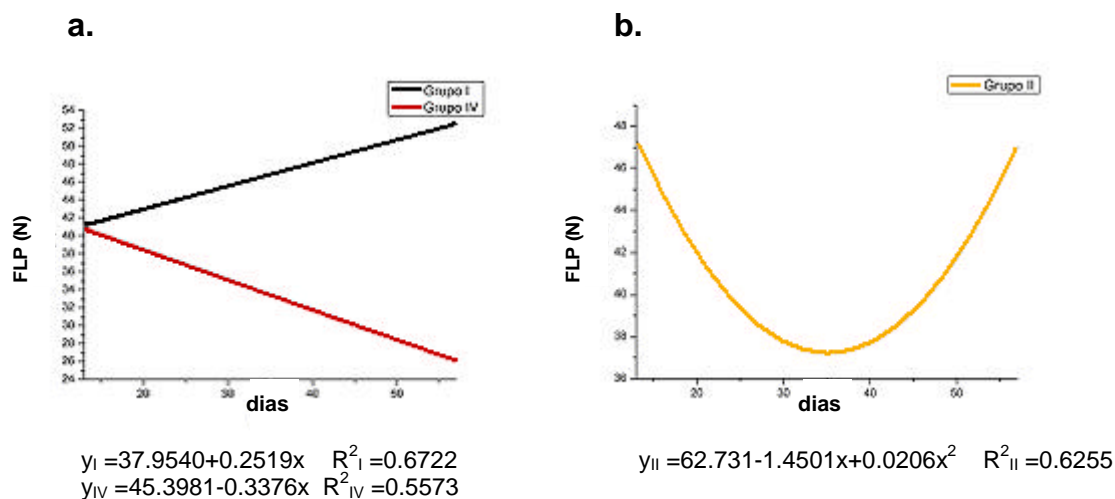


Gráfico 9. Médias de força até o limite de proporcionalidade (FLP) obtidas por flexão em tíbia nos grupos de machos I (a), II (b) e IV (a).

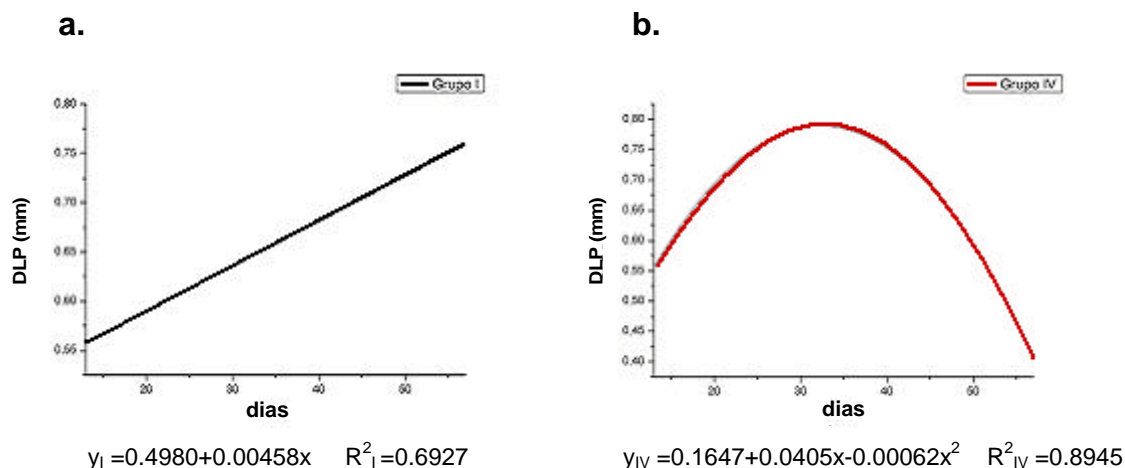


Gráfico 10. Médias de deformação até o limite de proporcionalidade (DLP) obtidas por flexão em tibia nos grupos de machos I (a) e IV(b).

Nos testes de tenacidade, as comparações entre tratamentos indicaram que o grupo I apresentou maior habilidade em absorver energia sob condições de aplicação de carga e trabalho realizado pelo mesmo ao ser submetido a variações crescentes de carga até o ponto de ruptura. Os grupos III e II, que tiveram comportamentos semelhantes, tiveram médias inferiores ao grupo I. E o grupo IV obteve a menor média de tenacidade (Tabelas 11 e 12).

No caso dos testes de resiliência, a comparação das médias entre tratamentos indicou que os grupos I, II, III e IV possuem capacidades distintas de absorver energia de forma elástica, ou de permitir que o osso retorne a sua forma anterior após a retirada da carga aplicada. Sendo que o grupo I obteve a maior média de resiliência seguido pelos grupos II, III e IV respectivamente (Tabelas 11 e 13). Na comparação entre tratamentos e períodos de coleta houve interação entre os grupos I e IV (Gráfico 11).

As comparações das médias entre tratamentos nos testes de rigidez demonstraram que os grupos I e II, que apresentaram comportamentos semelhantes, possuem maior habilidade em resistir a deformações em função das tensões aplicadas. Enquanto que, o grupo III apresentou média inferior e comportamento distinto dos grupos citados. E a menor média foi observada no grupo IV (Tabelas 11 e 14). Com relação a comparação entre tratamentos e períodos de coleta, os grupos I e IV apresentaram resultados significativos estatisticamente (Gráfico 12).

Tabela 11. Médias de tenacidade, resiliência e rigidez obtidas por flexão em tibia nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	TENACIDADE (Jx10 ⁻³) * ²				RESILIÊNCIA (Jx10 ⁻³) * ¹ * ²				RIGIDEZ (10 ³ N/m) * ¹ * ²			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	33	29	34	27	12	13	13	12	74,69	86,55	57,07	82,03
28	49	46	46	35	13	14	12	12	64,58	48,51	68,92	34,89
42	64	34	39	25	16	12	11	10	86,49	71,08	76,27	47,55
56	56	45	50	28	20	14	12	6	63,73	73,84	53,31	62,68

*¹: significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*²: significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

Tabela 12. Comparação de médias de tenacidade entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (Jx10 ⁻³)
I	50.5 ^A
III	42.2 ^B
II	38.5 ^B
IV	28.7 ^C

A, B e C: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

Tabela 13. Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (Jx10 ⁻³)
I	15.25 ^A
II	13.25 ^{AB}
III	12.00 ^{BC}
IV	10.00 ^C

A, B e C: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

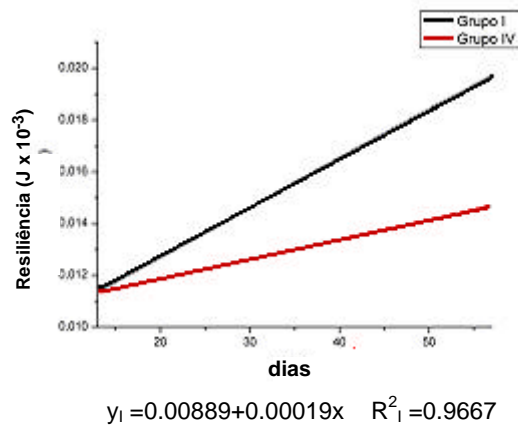


Gráfico 11. Comparação de médias de resiliência entre tratamentos e períodos de coleta dos grupos I e IV.

Tabela 14. Comparação de médias de rigidez entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (10^3 N/m)
I	72.37 ^A
II	69.99 ^A
III	63.89 ^{AB}
IV	56.78 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 5$)

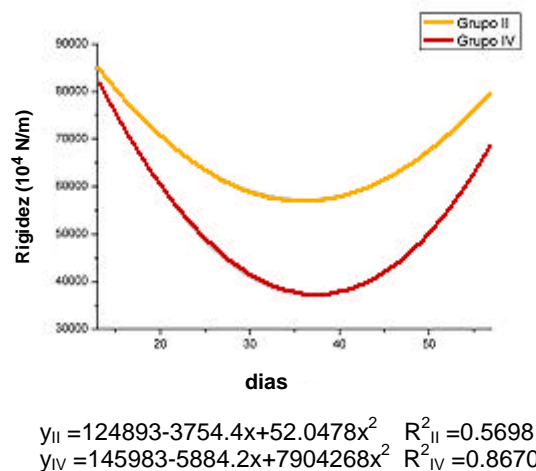


Gráfico 12. Comparação de médias de rigidez entre tratamentos e períodos de coleta dos grupos II e IV.

Os testes biomecânicos medindo força máxima até o ponto de ruptura constataram na comparação entre tratamentos que os grupos V e VI, que tiveram comportamentos semelhantes, apresentaram maior resistência para que

ocorresse a fratura, ou seja, precisou se aplicar mais força para que o osso se rompesse. Enquanto que, o grupo VIII teve média inferior aos grupos VI e V e o grupo VII a menor média de todos os grupos (Tabelas 15 e 16).

Com relação a deformação máxima até o ponto de ruptura os resultados não foram estatisticamente significativos para os grupos V, VI, VII e VIII (Tabela 15).

Tabela 15. Médias de força (FMPR) e deformação (DMPR) máximas até o ponto de ruptura obtidas por flexão em tibia nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETAS (dias)	FMPR (N) ^{*1 *2}				DMPR (mm) ^{*1}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	48,90	46,38	42,59	44,66	1,08	1,11	1,03	1,20
28	43,08	64,70	36,65	44,76	1,32	1,07	1,18	1,16
42	60,48	56,79	39,19	44,71	0,78	1,25	1,10	1,41
56	54,91	44,30	43,60	45,47	1,13	1,11	1,29	1,20

*¹: significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*²: significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

Tabela 16. Comparação de médias de força máxima até o ponto de ruptura entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (N)
VI	53.04 ^A
V	51.84 ^A
VIII	44.90 ^B
VII	40.51 ^C

A, B e C: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

Com relação aos testes de força até o limite de proporcionalidade, as comparações entre tratamentos demonstraram que os grupos V e VI, que tiveram médias semelhantes, necessitam de maior força aplicada para que haja algum dano ao osso. Na seqüência o grupo VIII com média inferior aos grupos citados. Sendo que o grupo VII teve a menor média em relação aos outros grupos (Tabelas 17 e 18). O grupo VIII apresentou a maior deformação em função da força recebida até o limite de proporcionalidade, ou seja, sofreu maior flexão sem que houvesse dano irreversível ao osso. Os grupos V, VI e VII apresentaram

médias semelhantes de deformação até o limite de proporcionalidade e inferiores ao grupo VIII (Tabelas 17 e 19).

Tabela 17. Médias de força (FLP) e deformação (DLP) até o limite de proporcionalidade obtidas por flexão em tibia nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETAS (dias)	FLP (N) ^{*1 *2}				DLP (mm) ^{*1 *2}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	34,80	35,69	32,06	35,29	0,61	0,67	0,63	0,82
28	32,82	45,85	26,87	33,20	0,80	0,64	0,72	0,72
42	44,94	32,16	27,51	35,20	0,48	0,53	0,57	0,80
56	39,53	32,79	29,44	28,01	0,63	0,69	0,67	0,56

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

Tabela 18. Comparação de médias de força até limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (N)
V	38.02 ^A
VI	36.62 ^A
VIII	32.93 ^B
VII	28.97 ^C

A, B e C: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

Tabela 19. Comparação de médias de deformação até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (mm)
VIII	0.73 ^A
VII	0.65 ^B
VI	0.63 ^B
V	0.63 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

Os testes de tenacidade, que indicam a habilidade do osso em absorver energia sob condições de aplicação de carga e trabalho realizado pelo mesmo ao ser submetido a variações crescentes de carga até o ponto de ruptura, não foram estatisticamente significativos tanto nas comparações entre tratamentos quanto nas comparações entre tratamentos e períodos de coleta para os grupos V, VI, VII e VIII (Tabela 20).

No caso dos testes de resiliência, a comparação das médias entre tratamentos indicou que os grupos V, VI, VII e VIII possuem capacidade semelhante de absorver energia de forma elástica, permitindo que o osso retorne a sua forma anterior após a retirada da carga (Tabelas 20 e 21).

As comparações das médias entre tratamentos nos testes de rigidez demonstraram que os grupos V e VI, que apresentaram comportamentos semelhantes, possuem maior habilidade em resistir a deformações em função das tensões aplicadas. Enquanto que, os grupos VII e VIII tiveram médias similares e inferiores aos grupos V e VI (Tabelas 20 e 22).

Tabela 20. Médias de tenacidade, resiliência e rigidez obtidas por flexão em tíbia nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETA (dias)	TENACIDADE ($J \times 10^{-3}$) * ¹				RESILIÊNCIA ($J \times 10^{-3}$) * ¹ * ²				RIGIDEZ (10^3 N/m) * ¹ * ²			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	30	30	26	28	10	12	10	14	57,15	50,70	50,70	43,53
28	33	39	24	29	13	15	09	11	41,10	73,42	37,56	47,50
42	25	43	26	41	10	08	07	14	94,92	62,78	49,33	43,63
56	38	28	32	31	12	11	10	08	65,80	48,28	43,79	49,34

*¹ : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta

*² : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos

ns: não significativo

Tabela 21. Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS ($J \times 10^{-3}$)
VIII	11.75 ^A
VI	11.50 ^A
V	11.25 ^A
VII	09.00 ^A

A: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 5$)

Tabela 22. Comparação de médias de rigidez entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (10 ³ N/m)
V	64.74 ^A
VI	58.79 ^A
VIII	46.00 ^B
VII	45.34 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<5)

5.3.2 Ensaio Mecânico de Compressão

O ensaio mecânico de compressão realizado em vértebras L5 permite a comparação dos valores obtidos das propriedades mecânicas com relação à resistência dos ossos nos diferentes grupos experimentais.

Nos testes para avaliar a força máxima aplicada até o ponto de ruptura, os resultados não foram estatisticamente significativos para os grupos I, II, III e IV (Tabela 23).

Os testes biomecânicos medindo deformação máxima até o ponto de ruptura constataram na comparação entre tratamentos que o grupo II necessitou de maior compressão para que ocorresse a fratura, ou seja, precisou se aplicar mais força para que o osso se rompesse. Enquanto que os grupos I, III e IV tiveram médias similares e inferiores ao grupo II (Tabelas 27 e 28).

Tabela 23. Médias de força (FMPR) e deformação (DMPR) máximas até o ponto de ruptura obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	FMPR (N) ^{ns}				DMPR (mm) ^{*1 *2}			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	100,31	140,86	140,35	130,47	0,84	1,44	0,68	0,70
28	198,02	189,10	218,18	162,27	0,69	0,86	0,66	0,48
42	131,20	164,16	153,52	155,74	0,55	0,54	0,54	0,67
56	187,15	150,52	140,53	135,74	0,89	0,83	0,58	0,49

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta (p<0,05)

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos (p<0,05)

ns: não significativo

Tabela 24. Comparação de médias de deformação máxima até o ponto de ruptura entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (mm)
II	0.92 ^A
I	0.74 ^B
III	0.61 ^B
IV	0.59 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

Com relação aos testes de força até o limite de proporcionalidade, as comparações entre períodos de coleta das médias dos grupos I, II, III e IV foram estatisticamente significativas (Tabela 25, Gráfico 13). Na comparação de médias entre tratamentos referente a contração até o limite de proporcionalidade, o grupo II apresentou a maior deformação em função da força recebida até o limite de proporcionalidade, ou seja, sofreu maior contração sem que houvesse dano irreversível ao osso. Os grupos I, III e IV, apresentaram comportamentos diferentes de deformação até o limite de proporcionalidade com médias inferiores ao grupo II respectivamente (Tabelas 25 e 26). Com relação a comparação entre tratamentos e períodos de coleta houve comportamento significativo entre os grupos I, II e III (Gráfico 14).

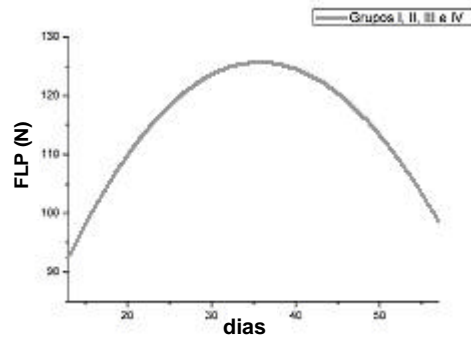
Tabela 25. Médias de força (FLP) e contração (CLP) até o limite de proporcionalidade obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETAS (dias)	FLP (N) ^{ns}				CLP (%) ^{*1 *2}			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	63,99	102,25	111,18	80,20	2,83	6,02	3,61	2,37
28	157,20	131,57	150,69	116,23	3,34	3,65	2,55	2,31
42	85,69	115,91	124,46	98,57	2,05	2,21	2,61	2,19
56	153,33	108,02	74,80	90,56	4,11	2,36	1,51	1,86

*1: significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta ($p < 0,05$)

*2: significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos ($p < 0,05$)

ns: não significativo



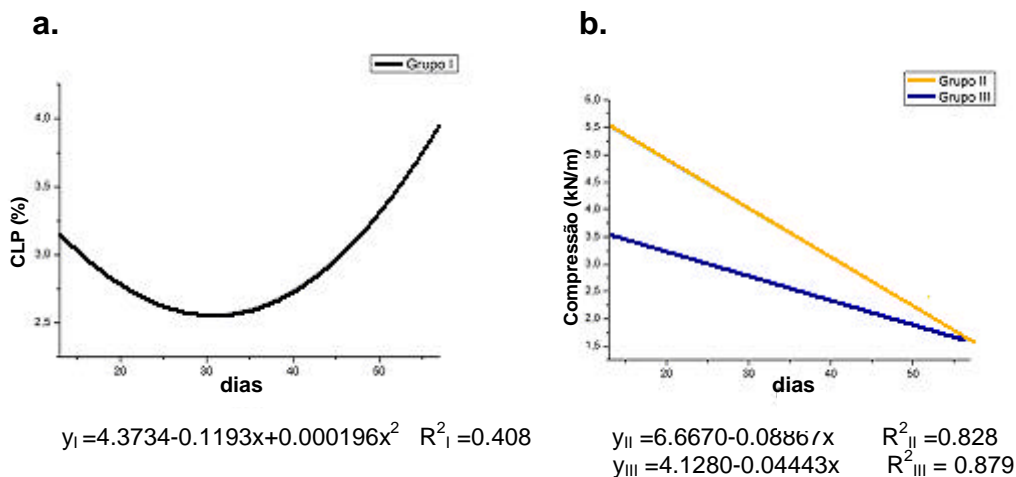
$$y = 44.27 + 4.511x - 0.0625x^2 \quad R^2 = 0.480$$

Gráfico 13. Comparação das médias de força até o limite de proporcionalidade (FLP) entre períodos de coleta dos grupos I, II, III e IV.

Tabela 26. Comparação de médias de contração até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (%)
II	3.56 ^A
I	3.08 ^{AB}
III	2.57 ^{BC}
IV	2.18 ^C

A, B e C: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)



$$y_I = 4.3734 - 0.1193x + 0.000196x^2 \quad R^2_I = 0.408$$

$$y_{II} = 6.6670 - 0.0886/x \quad R^2_{II} = 0.828$$

$$y_{III} = 4.1280 - 0.04443x \quad R^2_{III} = 0.879$$

Gráfico 14. Comparação das médias de contração até o limite de proporcionalidade (CLP) entre períodos de coleta dos grupos I, II e III.

Os resultados obtidos pelo teste de compressão foram estatisticamente significativos entre períodos de coleta segundo a análise de variância (ANOVA) para os grupos I, II, III e IV (Tabela 27, Gráfico 15).

No caso dos testes de resiliência, a comparação das médias entre tratamentos indicou que os grupos I e II, que apresentaram médias similares, possuem capacidade semelhante de absorver energia de forma elástica, permitindo que o osso retorne a sua forma anterior após a retirada da carga. Enquanto que o grupo III apresentou média inferior aos grupos citados. E o grupo IV obteve a menor média de resiliência (Tabelas 27 e 28).

Tabela 27. Médias de compressão e resiliência obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.

GRUPOS COLETA (dias)	COMPRESSÃO (kN/m) ^{ns}				RESILIÊNCIA (10 ⁻⁶ J) ^{*1 *2}			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
14	0,66	0,92	0,92	0,85	16,9	40,0	22,8	16,6
28	1,29	1,24	1,43	1,06	23,4	26,7	16,9	13,8
42	0,86	1,07	1,00	1,02	15,7	15,5	18,3	15,4
56	1,22	0,98	0,92	0,89	32,9	15,7	11,0	13,7

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta (p<0,05)

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos (p<0,05)

ns: não significativo

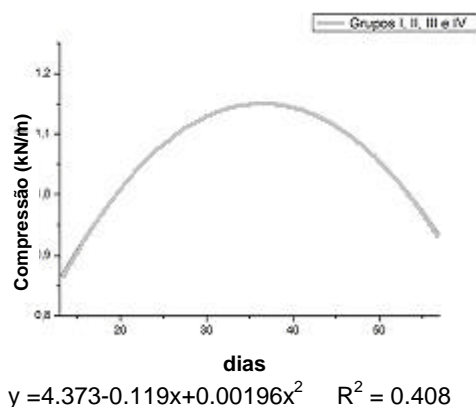


Gráfico 15. Médias de compressão obtidas em vértebras L5 nos grupos de machos I, II, III e IV.

Tabela 28. Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos I, II, III e IV.

GRUPOS	MÉDIAS (10 ⁻⁶ J)
II	24.47 ^A
I	22.22 ^A
III	17.25 ^{AB}
IV	14.87 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<0,05)

Nos testes para avaliar a força máxima aplicada até o ponto de ruptura, as comparações entre tratamentos demonstraram comportamento similar nos grupos V, VI e VII. Sendo que o grupo VIII obteve a menor média e comportamento distinto dos outros grupos (Tabelas 29 e 30).

Os resultados dos testes de deformação máxima até o ponto de ruptura não apresentaram significância estatística para os grupos V, VI, VII e VIII (Tabela 29).

Tabela 29. Médias de força (FMPR) e deformação (DMPR) máximas até o ponto de ruptura obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETAS (dias)	FMPR (N) ^{*2}				DMPR (mm) ^{ns}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	136,60	84,70	146,88	117,35	0,50	0,72	0,39	0,71
28	174,28	199,08	179,60	156,36	0,57	0,69	0,55	0,64
42	181,46	176,67	174,98	129,27	0,73	0,57	0,60	0,58
56	180,56	167,12	165,31	128,26	0,66	0,59	0,58	0,54

*1: significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta (p<0,05)

*2: significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos (p<0,05)

ns: não significativo

Tabela 30. Comparação de médias de força máxima até o ponto de ruptura entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (N)
V	168.22 ^A
VII	166.69 ^A
VI	156.89 ^A
VIII	132.81 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

Com relação aos testes de força até o limite de proporcionalidade, as comparações de médias entre tratamentos dos grupos V, VI e VII apresentaram-se de maneira similar indicando que estes grupos resistem a aproximadamente mesma força de compressão sem que ocorra dano ao osso. E o grupo VIII teve um comportamento diferente apresentando a menor média para este teste (Tabelas 31 e 32).

Na comparação de médias entre tratamentos referente a contração até o limite de proporcionalidade, os grupos VI e V, que tiveram comportamentos similares, apresentaram maior deformação em função da força aplicada sobre estes, ou seja, sofreram maior contração antes que houvesse dano irreversível ao osso. Os grupos VIII e VII apresentaram comportamentos semelhantes de deformação até o limite de proporcionalidade e médias inferiores aos outros grupos (Tabelas 31 e 33).

Tabela 31. Médias de força (FLP) e contração (CLP) até o limite de proporcionalidade obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETAS (dias)	FLP (N) ^{*2}				CLP (%) ^{*2}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	115,39	67,81	125,02	65,07	3,03	3,42	2,22	2,19
28	140,70	144,74	143,19	120,57	3,33	3,22	2,41	3,18
42	146,22	151,31	127,95	76,72	2,97	3,71	2,85	1,86
56	138,89	133,97	103,90	87,99	3,15	2,73	1,93	2,33

*1: significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta ($p < 0,05$)

*2: significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos ($p < 0,05$)

ns: não significativo

Tabela 32. Comparação de médias de força até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (N)
V	135.30 ^A
VII	125.02 ^A
VI	124.46 ^A
VIII	87.59 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

Tabela 33. Comparação de médias de contração até o limite de proporcionalidade entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (%)
VI	3.27 ^A
V	3.12 ^A
VIII	2.39 ^B
VII	2.35 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

Os testes de compressão revelaram na comparação de médias entre tratamentos um comportamento similar dos grupos V, VI e VII, que indica capacidade semelhante de resistir a força aplicada sobre estes grupos. E o grupo VIII apresentou uma média inferior aos outros grupos para este teste (Tabelas 34 e 35).

No caso dos testes de resiliência, a comparação das médias entre tratamentos indicou que os grupos V e VI, que apresentaram médias similares, possuem capacidade semelhante de absorver energia de forma elástica, permitindo que o osso retorne a sua forma anterior após a retirada da carga. Enquanto que o grupo VII apresentou média inferior aos grupos citados, o grupo VIII obteve a menor média (Tabelas 34 e 36).

Tabela 34. Médias de compressão e resiliência médias obtidas por compressão em vértebras L5 nos grupos de fêmeas V, VI, VII e VIII.

GRUPOS COLETA (dias)	COMPRESSÃO (kN/m) ^{*2}				RESILIÊNCIA (10 ⁻⁶ J) ^{*2}			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
14	0,89	0,55	0,96	0,77	18,2	20,5	13,3	13,8
28	1,14	1,30	1,17	1,02	21,0	20,4	14,4	21,1
42	1,19	1,16	1,15	0,84	19,7	26,0	17,1	12,3
56	1,18	1,09	1,08	0,84	22,0	17,2	12,2	16,3

*1 : significativo a 5% de probabilidade para interação tratamentos e períodos de coleta (p<0,05)

*2 : significativo a 5% de probabilidade para interação entre tratamentos (p<0,05)

ns: não significativo

Tabela 35. Comparação de médias de compressão entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (kN/m)
V	1.10 ^A
VII	1.09 ^A
VI	1.03 ^A
VIII	0.87 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<0,05)

Tabela 36. Comparação de médias de resiliência entre tratamentos dos grupos V, VI, VII e VIII.

GRUPOS	MÉDIAS (10 ⁻⁶ J)
VI	21.02 ^A
V	20.22 ^A
VIII	15.87 ^{AB}
VII	14.25 ^B

A e B: Comparações a 5% de probabilidade (p<0,05)

6- DISCUSSÃO

O modelo animal com ratos para estudo da indução de osteoporose pós-menopausa ou pela administração de glicocorticóides vem adquirindo grande aceitação nos últimos anos. A proposta deste modelo é comprovar que se consegue estabelecer a osteoporose, e a partir de qual momento isto ocorre, tanto em machos como em fêmeas, seja por meio da castração, ou da administração de glicocorticóides, ou ainda, pela associação da castração com a administração de glicocorticóides.

A discussão dos resultados da análise quantitativa dos constituintes plasmáticos (cálcio, fósforo e proteínas totais) e do tecido ósseo (cálcio, fósforo e magnésio), e a avaliação dos testes biomecânicos de flexão e compressão dos grupos experimentais foi dividida para avaliação dos diferentes tratamentos entre os grupos de machos e entre os grupos de fêmeas, pois existem diferenças significativas entre os gêneros. Embora não se tenha obtido resultados significativos ($p < 0,05$) para todos os constituintes avaliados em todos os grupos, se pode observar em um panorama geral as diferenças comportamentais destes grupos durante o período experimental.

As concentrações de cálcio plasmático e ósseo, por exemplo, não foram significativas estatisticamente, mas as concentrações plasmáticas deste constituinte se mantiveram estáveis dentro dos limites esperados para sua homeostasia nos grupos I, II, III e IV. Estes resultados são compatíveis com estudos que afirmam que a prioridade do organismo consiste em manter a homeostasia do cálcio, mobilizando este constituinte principalmente dos ossos, e

também aumentando sua absorção intestinal e reabsorção renal (SWENSON & REECE, 1993; NORDIN, 1997).

O grupo II manteve adequada a proporção cálcio:fósforo plasmática, enquanto que a proporção óssea final destes constituintes ficou abaixo da concentração esperada (1,4:1). Este valor é indicativo de desequilíbrio na remodelação óssea em favor da reabsorção, confirmando estudos que constatarem a perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos em modelos de ratos castrados, devido às suas similaridades com a doença em humanos (DEMPSTER et al., 1995), incluindo um aumento do *turnover* ósseo e uma rápida perda óssea na fase inicial da deficiência de estrógenos (MUNDY, 2000; DEMPSTER et al., 1995; MOKESILDE, 1995; KALU, 1991), ou ainda, segundo trabalhos de HARADA & RODAN (2003) e HULLEY (2002) uma perda óssea devida ao aumento na atividade dos osteoclastos que se traduz por uma elevação na taxa de reabsorção. Pode-se inferir que este resultado é semelhante ao que tem sido descrito em homens que foram castrados, ou seja, há uma perda óssea rápida, similar ao que ocorre em mulheres castradas ou na menopausa (ENRIORI & ENRIORI, 2002; RIGGS et al., 2002), que é relacionada diretamente com o declínio nos níveis de estrógenos (BILEZIKIAN et al., 1999).

Com relação às proteínas totais, o grupo II apresentou a maior média entre tratamentos, possivelmente devido a redução significativa de testosterona. Este achado é plausível levando-se em consideração que existem trabalhos afirmando que a testosterona atua fazendo deposição de proteínas plasmáticas nos tecidos do organismo (GUYTON & HALL, 1997), então no caso de deficiência deste hormônio espera-se um aumento na concentração das proteínas plasmáticas. Por outro lado, este grupo apresentou a segunda maior concentração de magnésio ósseo, o que está de acordo com estudos que relatam que a testosterona periférica (residual ou produzida pelas adrenais) é aromatizada em estrógeno contribuindo para que não haja desequilíbrio muito severo na remodelação óssea (ENRIORI & ENRIORI, 2002; SEEMAN, 1999). E confirmando estudo sobre magnésio, se houvesse elevação considerável nos níveis de PTH a concentração óssea desse constituinte se apresentaria reduzida (SARIS et al., 2000). Ainda corroborando com outro trabalho sobre perda óssea logo após a castração, o qual afirma que existe um aumento da liberação de cálcio do osso

para o *pool* extracelular, e que o organismo previne a hipercalcemia pela redução da absorção intestinal, aumento da excreção renal deste, e pela supressão parcial na secreção de PTH (RIGGS et al., 2002).

Ao se associarem as análises de concentração plasmática e óssea dos constituintes referidos com os testes biomecânicos, se consegue observar com mais clareza os efeitos da castração e/ou da terapia com glicocorticóides ou de ambos nos diversos grupos experimentais. Mas como no caso das análises quantitativas nem todos os parâmetros biomecânicos tiveram resultados significativos.

Os resultados das análises dos testes biomecânicos de flexão em tíbia no grupo I indicam que houve um aumento linear na resistência óssea durante o período experimental, apresentando as maiores médias de tenacidade, resiliência e rigidez. Enquanto que o grupo II, por sua vez, obteve redução na resistência a fratura de acordo com a força aplicada e aumento de deformação no decorrer do experimento, indicando menor conteúdo mineral ósseo e conseqüentemente menor rigidez. THOMPSON et al. (1995) constataram que o efeito imediato após a ovariectomia em ratas é principalmente a perda de osso esponjoso na tíbia proximal. Ainda, considerando que a resposta dos machos é igual a das fêmeas perante a deficiência de estrógenos (SEEMAN, 1999) e levando em consideração o trabalho de RIGGS et al. (2002) que relata uma perda óssea logo após a castração de fêmeas em torno de 20 a 30% de osso esponjoso e até 10% de osso cortical, sendo a perda de osso trabecular na tíbia após a castração definida pela redução do número de trabéculas sem a redução aparente da espessura destas (THOMPSON et al., 1995). E devido ao fato de os ratos não apresentarem remodelação haversiana secundária e nem sistema de remodelação bem definida do osso cortical sob condições normais (ORTOFT & OXLUND, 1996), pode se inferir que deve ter havido perda óssea trabecular e cortical suficiente para que fosse observada no teste de flexão.

Os testes de compressão em vértebra L5 do grupo II demonstraram uma redução gradual na capacidade de deformação até a ruptura do osso, o que corresponde à habilidade de absorver energia. Este resultado indica que houve pouca perda óssea, igual ao que foi constatado no grupo controle, confirmando mais uma vez que a semelhança do que ocorre nas fêmeas após a ovariectomia

(SEEMAN, 1999), o resultado direto da deficiência de estrógenos após a orquiectomia é a perda óssea relacionada com a redução na espessura das placas trabeculares e não com o número destas, como no caso da tíbia (THOMPSON et al., 1995). Por outro lado, se deve considerar que o diâmetro da vértebra é de importância crucial para que ocorra a fratura (BILEZIKIAN et al., 1999). Além disso, alguns estudos admitem que associando uma provável redução mínima na espessura das trabéculas (THOMPSON et al., 1995) com o tamanho do corpo vertebral, que é maior nos machos e exige naturalmente maior força aplicada para ocorrência de fraturas (BILEZIKIAN et al., 1999), podem-se explicar os valores não significativos no teste de compressão que foram observados no grupo II em relação ao grupo controle.

No caso do grupo III a relação cálcio:fósforo plasmática adequada foi atingida aos 42 dias de experimento e se manteve até os 56 dias, enquanto que houve desequilíbrio na concentração óssea destes constituintes a partir dos 42 dias e permaneceu até o final do experimento (1,4:1). Considerando que no início do experimento a proporção cálcio:fósforo plasmática estava inferior ao esperado, se deduz que houve um desequilíbrio na remodelação óssea devido ao tratamento com glicocorticóides e concomitantemente um aumento na secreção de PTH para liberar cálcio dos ossos, liberando também o magnésio, condizendo com os resultados observados, uma vez que este grupo apresentou a menor concentração deste mineral no osso. Estes resultados estão de acordo com estudos que relatam que os glicocorticóides agem reduzindo a absorção intestinal de cálcio, aumentando a excreção renal deste mineral e conseqüentemente reduzindo sua concentração sérica, que por sua vez estimula a secreção de PTH (McILWAIN, 2003; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; HULLEY et al., 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998). E ainda, como há indícios de aumento da secreção de PTH, este deve reduzir a concentração óssea de magnésio liberando-o e aumentando sua absorção intestinal de acordo com estudos de SARIS et al. (2000), sendo que esta afirmação é confirmada pelos resultados obtidos para este grupo. É importante lembrar que o provável aumento nos níveis séricos do PTH foi por um curto período de tempo, o suficiente para liberar minerais do tecido ósseo mas não a ponto de instalar um quadro de

hiperparatireoidismo secundário, pois não se realizou uma terapia crônica com glicocorticóides.

Com relação às proteínas plasmáticas, o grupo III teve um comportamento similar ao grupo controle e média um pouco superior, condizendo com o fato de que os glicocorticóides liberam proteínas dos tecidos no plasma (GUYTON & HALL, 1997) e tem efeito inibitório sobre as gonadotropinas da pituitária provocando um declínio nos níveis de testosterona (McILWAIN, 2003; HULLEY et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998). Assim sendo, reduzem-se os níveis de estrógenos derivados da aromatização dos andrógenos, alterando desta forma a deposição de proteínas em diversos tecidos pela deficiência de testosterona (GUYTON & HALL, 1997) o que se traduz em alteração da remodelação óssea pela deficiência de estrógenos. Então, os resultados obtidos das concentrações de proteínas totais plasmáticas superiores aos do grupo controle estão corroborando com os estudos relacionados acima.

Os resultados obtidos nos testes biomecânicos de flexão do grupo III somente foram significativos ($p < 0,05$) na comparação de médias entre tratamentos para tenacidade, resiliência e rigidez. As médias deste grupo, quando comparadas às do grupo I indicaram menor habilidade em absorver energia, ou ainda, menor capacidade de resistir ao impacto mecânico. Os grupos II e III apresentaram o mesmo comportamento para absorver energia. O grupo III obteve menor média de rigidez, o que confirma os resultados obtidos na quantificação de cálcio e magnésio para este grupo (médias inferiores ao grupo I), estando de acordo com trabalhos que afirmam que o tratamento com glicocorticóides reduz o grau de mineralização, aumenta a reabsorção óssea (McILWAIN, 2003; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ORTOFT & OXLUND, 1996) e excreção do cálcio, reduzindo sua concentração sérica e elevando os níveis de PTH. Sendo que o PTH estimula a perda óssea trabecular e também cortical de forma significativa, embora sem caracterizar um quadro de hiperparatireoidismo (RUBIN & BILEZIKIAN, 2002). Este comportamento apresentado pelo grupo III também está de acordo com estudo que afirma que a terapia com glicocorticóides diminui a qualidade óssea com conseqüente perda de resistência mecânica dos ossos longos que pode ser constatado por testes biomecânicos (ORTOFT & OXLUND, 1996).

Já, os resultados dos testes de compressão em vértebra L5 no grupo III permitiram observar que houve uma redução gradual na capacidade de deformação do osso em função da força aplicada e também uma redução na capacidade de absorver energia de acordo com os resultados de resiliência que mostram média inferior aos grupos I e II. Os resultados destes testes estão compatíveis com estudos que indicam haver redução na mineralização do tecido ósseo e aumento da fragilidade de vértebras provavelmente por apoptose de osteoblastos, principalmente nas trabéculas e em menor proporção no osso cortical (HULLEY et al., 2002). Outros trabalhos confirmam aumento na incidência de fraturas vertebrais (MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998), que se deduz ser devido a redução da espessura das placas trabeculares (McILWAIN, 2003) como conseqüência da terapia com glicocorticóides (HULLEY et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

O grupo IV apresentou concentrações plasmáticas de cálcio:fósforo nos níveis normais e dentro de limites constantes durante todo o período de experimento de acordo com o esperado, pois segundo SWENSON & REECE (1993) nos períodos de deficiência, o cálcio e o fósforo são rapidamente mobilizados dos ossos e disponibilizados para o sangue e outros tecidos moles. Este grupo além da castração, recebeu tratamento com glicocorticóides, que age inibindo a atividade das gonadotropinas da pituitária provocando um declínio cumulativo com a castração nos níveis de testosterona de origem gonadal e adrenal (McILWAIN, 2003; HULLEY et al., 2002; RIGGS et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998). Esta terapia também induz uma concentração de proteínas totais superior ao grupo I, pelo fato desse hormônio fazer deposição destas proteínas nos tecidos como citado anteriormente (SWENSON & REECE, 1993).

Com relação às concentrações dos constituintes ósseos do grupo IV, embora os resultados das médias de cálcio não tenham sido significativas, observou-se redução progressiva na proporção cálcio:fósforo até os 42 dias de experimento, sendo que aos 56 dias houve um aumento como provável conseqüência do término da ação do glicocorticóide, e ainda assim a proporção final (1,5:1) foi inferior à concentração normal. E este achado está de acordo com estudos que afirmam que na primeira fase da ação dos glicocorticóides no tecido

ósseo ocorre uma perda óssea rápida pelo desequilíbrio na remodelação óssea, havendo aumento na reabsorção e redução na formação (McILWAIN, 2003; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998). Confirmando este dado, o grupo IV apresentou concentração média de magnésio similar ao grupo III e inferior ao grupo I, como um efeito da castração e do tratamento com glicocorticóide, indicando que é provável ter havido alteração na remodelação óssea o que conseqüentemente levaria a um aumento na secreção de PTH devido a uma redução do cálcio sérico (McILWAIN, 2003; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000). Então, este hormônio induziria aumento da taxa de reabsorção óssea com redução na concentração de magnésio (SARIS et al., 2000).

Os resultados obtidos nos testes de flexão do grupo IV foram significativos ($p < 0,05$) para todos os parâmetros avaliados, sendo que isto permitiu analisar com maior confiabilidade o comportamento deste grupo. O grupo IV apresentou um aumento significativo na fragilidade do tecido ósseo indicado pela redução na capacidade de resistir a força aplicada. O osso submetido ao teste de flexão apresentou um período de maior deformação em relação a força aplicada na metade do experimento sugerindo uma redução do conteúdo mineral e, logo após, uma redução na deformação concomitante com uma redução da força aplicada que demonstra uma fragilidade óssea acentuada em comparação com os grupos I, II e III. Os trabalhos relacionados com a castração e efeitos dos glicocorticóides, afirmam que a perda de osso trabecular na tíbia após a castração é definida pela redução do número de trabéculas sem a redução aparente da espessura destas (THOMPSON et al., 1995), e que o tratamento com glicocorticóides reduz o grau de mineralização e aumenta a reabsorção óssea (McILWAIN, 2003; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ORTOFT & OXLUND, 1996). E ainda, com relação aos estudos sobre terapia com glicocorticóides, descreve-se um aumento na excreção renal do cálcio com conseqüente redução sérica deste constituinte, o que leva a um aumento nos níveis de PTH, que por sua vez, estimula a perda óssea trabecular e também cortical de forma significativa, embora sem a caracterização de um quadro de hiperparatireoidismo (RUBIN & BILEZIKIAN, 2002). Os resultados obtidos nos testes biomecânicos são confirmados por trabalho que relata que este tratamento diminui a qualidade

óssea com conseqüente perda de resistência mecânica dos ossos longos (ORTOFT & OXLUND, 1996). Os resultados observados para este grupo concordam com os trabalhos citados demonstrando uma redução na qualidade óssea que se reflete em menor resistência à fratura nos testes de flexão.

Nos testes de compressão em vértebra L5, os resultados obtidos do grupo IV demonstraram menor habilidade de deformação do osso em função da carga aplicada e menor capacidade em absorver energia que os grupos I, II e III. Sendo que isto indica que ocorreu perda óssea significativa tornando o osso mais frágil e ressaltando que, com relação ao comportamento, os grupos III e IV agiram de forma semelhante. Os resultados obtidos do grupo IV para estes testes estão compatíveis com estudos que indicam haver uma redução na resistência mecânica óssea possivelmente por apoptose de osteoblastos, principalmente nas trabéculas e em menor proporção no osso cortical, e também um declínio na deposição de minerais no tecido ósseo (HULLEY et al., 2002). Outros trabalhos confirmam este achado citando um aumento na incidência de fraturas vertebrais (MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998) que se deve provavelmente às placas trabeculares se apresentarem menos espessas (McILWAIN, 2003) como conseqüência do tratamento com glicocorticóides (HULLEY et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

E ainda, o efeito da deficiência de estrógenos após a orquiectomia é descrito como a perda óssea relacionada com a redução na espessura das placas trabeculares e não com o número destas como no caso da tíbia (THOMPSON et al, 1995), sem deixar de considerar que o diâmetro da vértebra é de importância crucial para que ocorra a fratura (BILEZIKIAN et al., 1999). Então apesar do tamanho do corpo vertebral dos machos ser maior do que o das fêmeas, ainda assim, pode se observar o efeito cumulativo dos dois procedimentos empregados neste grupo (castração e terapia com glicocorticóides) que apresentou uma acentuada fragilidade óssea quando comparado com os outros grupos experimentais.

Nas análises quantitativas de constituintes plasmáticos e ósseos nos grupos de fêmeas constatou-se comportamentos distintos dos grupos de machos sob alguns aspectos.

A concentração média de cálcio plasmático apresentou resultados significativos ($p < 0,05$) entre períodos de coleta nos grupos V, VI, VII e VIII, reduzindo-se durante o experimento, mas mantendo uma proporção adequada de cálcio e fósforo plasmáticos. Corroborando com SWENSON & REECE (1993) que afirmam que nos períodos de deficiência, o cálcio e o fósforo são rapidamente mobilizados dos ossos e disponibilizados para o sangue e outros tecidos moles.

O grupo VI obteve concentrações adequadas de cálcio:fósforo plasmáticos durante todo o período de experimento, enquanto que as concentrações ósseas destes constituintes reduziram-se apresentando uma proporção abaixo do limite normal (1,4:1). A deficiência de estrógenos se reflete em um desequilíbrio na remodelação óssea, ocorrendo maior reabsorção do que formação (HARADA & RODAN, 2003; ABE et al., 1999; SEEMAN, 1999; DEMPSTER et al., 1995; DEMPSTER & LINDSAY, 1993), embora deva se considerar que nos primeiros trinta dias após a castração possa ocorrer um aumento na formação óssea na tentativa de reverter o quadro de perda óssea devido a reabsorção mais acentuada (TANIZAWA et al., 2000). E apesar da concentração de proteínas plasmáticas e do magnésio ósseo não terem apresentado resultados significativos ($p > 0,05$), suas médias foram inferiores as do grupo I durante todo o experimento.

Ainda com relação as proteínas plasmáticas, a deficiência de estrógenos não interfere de maneira significativa, porque ao contrário da testosterona, estes fazem uma deposição mínima de proteínas nos tecidos (SWENSON & REECE, 1993). Vários estudos afirmam que após a ovariectomia existe uma fase de perda óssea rápida na qual ocorre uma elevação na liberação de cálcio do tecido ósseo para o *pool* extracelular e conseqüentemente aumentando sua concentração sérica (RIGGS et al., 2002 MUNDY, 2000; DEMPSTER et al., 1995; MOKESILDE, 1995; KALU, 1991). Então, para manutenção da homeostasia do cálcio, a hipercalcemia é prevenida pelo aumento da sua excreção renal, pela redução da absorção intestinal e pela supressão parcial da secreção de PTH (RIGGS et al., 2002).

Ainda com relação às alterações da concentração óssea de magnésio do grupo VI durante o período experimental se pode sugerir que nos trinta primeiros dias após a ovariectomia houve a tentativa de equilibrar a remodelação óssea

aumentando a formação além da reabsorção (TANIZAWA et al., 2000). Então, na primeira parte do experimento se pode deduzir que houve redução do cálcio sérico que foi utilizado para formação óssea e como consequência, os níveis de PTH devem ter se apresentado elevados até o momento que se obteve novamente a homeostasia do cálcio. Na segunda parte do experimento, ou seja, mais de trinta dias após a ovariectomia, a taxa de formação se estabilizou e a taxa de reabsorção permaneceu mais elevada mantendo o quadro de desequilíbrio na remodelação. E no que diz respeito a concentração óssea do magnésio, na primeira parte do experimento, sua concentração estava mais elevada, acompanhando o suposto aumento da formação óssea e, na segunda parte, se apresentou inferior ao grupo controle porque a taxa de reabsorção estava superior a formação óssea.

Os resultados obtidos nos testes de flexão do grupo VI mostraram um comportamento similar com o grupo V. Então, como sugerido anteriormente, dividindo-se o período experimental em duas partes, se observa que o grupo VI recebeu maior carga de força aplicada para que ocorresse fratura na primeira parte do experimento e que esta carga foi reduzida consideravelmente na segunda parte concordando com o fato de que após trinta dias de ovariectomia a remodelação não se encontra mais na tentativa de retornar ao equilíbrio tornando as consequências disto mais evidentes. E apesar deste grupo apresentar comportamento similar ao grupo controle em relação a comparação de média de rigidez entre tratamentos, ao se avaliar os resultados obtidos nos diferentes períodos de coleta, se observa uma redução crescente na rigidez a partir dos 28 dias de experimento, concordando novamente com os estudos referentes ao desequilíbrio na remodelação óssea após a ovariectomia. E, levando em consideração a ação da castração entre períodos de coleta, apesar de não terem apresentado resultados significativos, se pode sugerir uma redução no conteúdo mineral ósseo (cálcio e magnésio) e na resistência do tecido ósseo à flexão. Mas, no caso dos resultados que foram significativos ($p < 0,05$) na comparação de médias entre tratamentos, o grupo VI se comportou da mesma forma que o grupo controle. THOMPSON et al. (1995) sugeriram que como efeito imediato após a ovariectomia ratas perdem osso esponjoso na tíbia proximal e GOH et al. (1995), que a fratura dos ossos longos é correlacionada diretamente com a redução da

densidade mineral óssea, o que pode indicar que não houve redução de conteúdo mineral e perda óssea cortical significativa ($p < 0,05$) que pudesse ser observada no teste de flexão.

Nos testes biomecânicos de compressão em vértebra L5, os resultados obtidos dos grupos V, VI e VII demonstraram comportamento semelhante na capacidade de receber força aplicada, na habilidade de absorver energia e na força de compressão (kN/m), indicando que não houve perda óssea significativa ($p < 0,05$) nestes grupos, pois os resultados dos grupos tratados foram semelhantes aos resultados do grupo controle. Mas levando em consideração as médias obtidas entre períodos de coleta para este grupo, se observou a partir dos 28 dias de experimento uma redução crescente da carga de força aplicada para que ocorresse a fratura da mesma forma que foi verificada no teste de flexão. E também obteve média final de conteúdo mineral ósseo (cálcio, fósforo e magnésio), de resiliência e de compressão inferior ao grupo controle. Considerando estudo de THOMPSON et al. (1995) que relata como resultado direto da deficiência de estrógenos após a ovariectomia a perda óssea trabecular em vértebra lombar, também não se pode excluir o trabalho que afirma que para ocorrência de fraturas vertebrais por compressão o diâmetro do osso é de suma importância (BILEZIKIAN, 1999), e que além da microarquitetura óssea ter influência em aproximadamente 10 a 30% da variabilidade da resistência mecânica, também o volume de medula óssea pode interferir na conectividade trabecular (CORTET & MARCHANDISE, 2001). Então sugere-se que houve perda óssea mas com resultado não significativo para este grupo.

O grupo VII, com relação ao cálcio e fósforo plasmáticos, apresentou proporção adequada durante todo o experimento. E apesar de não atender a proporção adequada de cálcio:fósforo ósseos (1,3:1) apresentou a maior concentração destes minerais no osso quando comparado com os grupos V, VI e VIII. Ainda assim, apesar de não obter resultados significativos entre períodos de coleta, a partir dos 28 dias a proporção desses constituintes ósseos declinou até os 56 dias de experimento, indicando a ação da terapia com glicocorticóide em desequilibrar a remodelação óssea, causando um aumento na secreção de PTH, que conseqüentemente liberou cálcio dos ossos para manutenção da homeostasia deste. Estes resultados estão de acordo com estudos que relatam

que os glicocorticóides atuam alterando a remodelação óssea e o metabolismo do cálcio, induzindo duas fases de perda óssea: uma fase inicial, na qual ocorre uma perda rápida e acentuada (reduz a taxa de formação e aumenta a de reabsorção), e uma segunda fase, na qual a perda óssea é mais lenta (taxa de formação reduzida e a taxa de reabsorção também se reduz um pouco) (RIGGS et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002). E ainda, confirmando alguns trabalhos que relatam que os glicocorticóides reduzem a absorção intestinal de cálcio, aumentando a excreção renal deste mineral, tendo como consequência a redução da sua concentração sérica, que por sua vez, estimula uma elevação nos níveis séricos de PTH (McILWAIN, 2003; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; HULLEY et al., 2002; MANELLI & GIUSTINA 2000; ROUX et al., 1998).

A concentração de proteínas totais aumentou gradualmente, indicando que a terapia com glicocorticóide diminuiu a quantidade de proteínas na maioria dos tecidos elevando sua concentração no plasma (GUYTON & HALL, 1997) e provocou um efeito inibitório sobre as gonadotropinas da pituitária provocando um declínio nos níveis de estrógenos (McILWAIN, 2003; HULLEY et al., 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000; ROUX et al., 1998), o que se traduz em alteração da remodelação óssea pela deficiência de estrógenos (HARADA & RODAN, 2003; ABE et al., 1999; SEEMAN, 1999; DEMPSTER et al., 1995; DEMPSTER & LINDSAY, 1993). Sugere-se que houve um aumento na concentração de proteínas plasmáticas durante o período de experimento devido ao tratamento com glicocorticóides.

No caso da concentração do magnésio ósseo não houve resultados significativos, mas a concentração deste constituinte apresentou-se acentuadamente inferior a do grupo controle. E ainda, como há indícios de aumento da secreção de PTH, este deve reduzir a concentração óssea de magnésio liberando-o e aumentando sua absorção intestinal de acordo com estudos de SARIS et al. (2000), afirmação esta confirmada pelos resultados obtidos para este grupo. É importante lembrar que o provável aumento nos níveis séricos do PTH foi por um curto período de tempo, o suficiente para liberar minerais do tecido ósseo mas não a ponto de instalar um quadro de hiperparatireoidismo secundário, pois não se realizou uma terapia crônica com glicocorticóides.

Nos testes de flexão em tibia o grupo VII mostrou maior fragilidade óssea quando comparado com os grupos V, VI e VIII. Pois obteve a menor média de resistência a força aplicada até sua ruptura, apresentou maior deformação que os grupos V e VI e menor média de rigidez que os grupos V, VI e VIII indicando que este grupo possui menor conteúdo mineral ósseo. Estes resultados estão de acordo com McILWAIN (2003), MANELLI & GIUSTINA (2000), ORTOFT & OXLUND (1996) que relatam o aumento da reabsorção óssea após terapia com glicocorticóides, e com HULLEY et al. (2002), ORTOFT & OXLUND (1996), GOH et al. (1995) que afirmam que este tratamento em ratas causa redução da massa óssea cortical e da resistência mecânica de ossos longos.

No caso dos resultados dos testes de compressão em vértebra L5 do grupo VII, como citado anteriormente, não houve diferença de comportamento com os grupos V e VI com relação à fragilidade óssea. Apesar da afirmação de RUBIN & BILEZIKIAN (2002) de que o local tipicamente afetado pelo tratamento com glicocorticóide ser o osso trabecular das vértebras, GILSANZ (1998) comenta que a resistência das vértebras lombares é determinada também pela área total destas e que o tamanho da vértebra é fator determinante de fraturas.

Os animais do grupo VIII, assim como os do grupo IV, foram castrados e receberam tratamento com glicocorticóide, resultando assim em um efeito cumulativo de perda óssea. Este grupo apresentou homeostasia de cálcio e fósforo, mas por outro lado, mostrou concentrações destes constituintes inferiores no tecido ósseo aos outros grupos, com uma proporção abaixo da normal (1,3:1), provavelmente devido a ação conjunta do glicocorticóide e da deficiência de estrógenos. Este achado ocorre porque na deficiência de estrógenos se observa significativa perda de conteúdo mineral, com redução da absorção intestinal e aumento da excreção renal do cálcio (RIGGS et al., 2002; MANELLI & GIUSTINA, 2000; MOKESILDE, 1995; KALU, 1991), e uma alteração na remodelação óssea, ocorrendo maior reabsorção do que formação (HARADA & RODAN, 2003; ABE et al., 1999; SEEMAN, 1999; DEMPSTER et al., 1995; DEMPSTER & LINDSAY, 1993). E no caso do tratamento com glicocorticóide há um efeito cumulativo na redução na absorção intestinal de cálcio, no aumento da excreção renal deste mineral e conseqüentemente redução da sua concentração sérica, estimulando a secreção de PTH (McILWAIN, 2003; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002; HULLEY et al.,

2002; MANELLI & GIUSTINA 2000; ROUX et al., 1998) e ainda, uma potencialização da reabsorção óssea com concomitante redução na formação (RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

Os resultados dos testes de flexão do grupo VIII demonstraram perda óssea superior aos grupos V e VI, e comportamento similar ao grupo VII para a maioria dos parâmetros. Houve aumento da fragilidade óssea indicada por redução da resistência do osso em função da força aplicada e redução do conteúdo mineral ósseo observada em função da maior média de deformação em relação a carga aplicada, e média de rigidez similar ao grupo VII e inferior aos grupos V e VI. Estes resultados confirmam estudos de McILWAIN (2003), MANELLI & GIUSTINA (2000), ORTOFT & OXLUND (1996) que citam em seus estudos o desequilíbrio na remodelação óssea, com aumento da reabsorção e também de HULLEY et al. (2002), ORTOFT & OXLUND (1996), GOH et al. (1995) que descrevem a diminuição de massa óssea cortical e redução da resistência mecânica dos ossos longos como consequência da administração de glicocorticóides em ratas. E com relação a castração, THOMPSON et al. (1995) sugeriram que como efeito imediato após a ovariectomia, ratas perdem osso esponjoso na tíbia e GOH et al. (1995) que a fratura dos ossos longos é correlacionada diretamente com a redução da densidade mineral óssea. Sugere-se que o somatório dos efeitos dos tratamentos para este grupo tenham sido positivos para obtenção da fragilidade óssea e redução na resistência à fratura por flexão.

Nos testes biomecânicos de compressão em vértebra L5, os resultados do grupo VIII indicaram perda óssea, pois este grupo necessitou de menor carga de força aplicada para sua ruptura, apresentou menor capacidade em absorver energia sem injúria e menor média de compressão. Estes achados concordam com os estudos de THOMPSON et al. (1995) que descrevem a perda óssea trabecular em vértebra lombar como resultado direto da deficiência de estrógenos após a ovariectomia, com BILEZIKIAN (1999) que relata que para ocorrência de fraturas vertebrais por compressão o diâmetro do osso é de suma importância, e ainda, com CORTET & MARCHANDISE (2001) que afirmam que a microarquitetura óssea tem influência na variabilidade da resistência mecânica, como também o volume de medula óssea, que pode interferir na conectividade

trabecular. Do mesmo modo que nos testes de flexão, os resultados dos testes de compressão evidenciaram uma redução da resistência óssea como resultado da ação dos tratamentos empregados para o grupo VIII, que se deve provavelmente ao declínio dos níveis de mineralização e redução da espessura das placas trabeculares com conseqüente aumento da fragilidade óssea.

6- CONCLUSÕES

Baseado nos resultados do presente estudo pode-se concluir:

1. A associação da deficiência de estrógenos e tratamento com glicocorticóides induz alterações ósseas compatíveis com a Osteoporose, tanto em machos como em fêmeas.
2. A rápida perda óssea observada nos ratos após a orquiectomia e a ovariectomia é similar ao que ocorre em homens e mulheres, submetidos a estes procedimentos cirúrgicos, ou no período inicial da menopausa.
3. A concentração plasmática de cálcio, fósforo e proteínas totais durante o período de observação não indicou isoladamente o estabelecimento do quadro de osteoporose.
4. A proporção de cálcio:fósforo do tecido ósseo apresentou desequilíbrio indicativo de Osteoporose para todos os grupos experimentais, sendo que nos grupos de machos a partir dos 28 dias do período de observação, e a partir dos 42 dias para os grupos de fêmeas. Esta alteração foi mais acentuada nos grupos de fêmeas inteiras e castradas que receberam tratamento com glicocorticóide (1,3:1) e nos grupos de machos castrados e machos que receberam a terapia com glicocorticóide (1,4:1).

5. A concentração de magnésio ósseo foi indicativa de desequilíbrio na remodelação óssea apresentando-se consideravelmente inferior nos grupos experimentais em relação aos grupos controle. Sendo que os resultados mais significativos foram observados no grupo de machos inteiros e de fêmeas castradas que receberam terapia com glicocorticóide.
6. Os testes biomecânicos de flexão em tíbia confirmaram o declínio do conteúdo mineral ósseo pela redução da resistência a fratura nos grupos experimentais como esperado no quadro de Osteoporose. O grupo de machos castrados e de fêmeas inteiras submetidos a tratamento com glicocorticóide apresentaram maior fragilidade óssea.
7. Os testes biomecânicos de compressão em vértebras L5 demonstraram declínio na resistência a fratura assim como os testes de flexão, sugerindo um aumento na fragilidade óssea dos grupos experimentais devido aos tratamentos recebidos. Os grupos de machos e fêmeas castrados submetidos à terapia com glicocorticóide apresentaram-se os mais frágeis com relação à resistência a fratura.

Perspectivas Futuras

O modelo que associa os efeitos da castração com o uso da sobredosagem de glicocorticóides por período pré-determinado apresenta alterações do metabolismo ósseo como esperado, devendo se considerar o uso de animais jovens que atingiram a maturidade sexual pelo fato de apresentarem maior resposta em relação à remodelação óssea (ou a deficiência de estrógenos) que animais mais idosos.

E, com relação aos constituintes plasmáticos, é interessante realizar a dosagem complementar de albumina plasmática, pois aproximadamente 50% do cálcio plasmático se encontra ligado a esta proteína; de magnésio plasmático, para se observar o comportamento deste mineral paralelamente no sangue e no tecido ósseo, e ainda, de marcadores de remodelação óssea como por exemplo, a fosfatase alcalina óssea.

É importante considerar também o uso do diagnóstico por imagem, como a densitometria óssea, que é utilizada na rotina da medicina humana para se avaliar a densidade mineral óssea.

A histopatologia é outra análise fundamental para se obter informações mais precisas sobre a remodelação óssea durante o período experimental.

Concluindo-se então, que além da metodologia utilizada, o uso de ferramentas como a histopatologia, diagnóstico por imagem e dosagem de marcadores de remodelação óssea são de fundamental importância para o diagnóstico definitivo da Osteoporose.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; SATO, K.; MIYAKOSHI, N. KUDO, T.; TAMURA, Y.; TSUCHIDA, T.; KASUKAWA, Y. Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. **Bone**, n. 6, v. 24, p. 591-596, 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, 3. ed. Porto Alegre, p. 1182-1184, 1997.

BAGI, C. M.; WILKIE, D.; GEORGELOS, K.; WILLIAMS, D.; BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone**, n. 3, v. 21, p. 261-267, 1997.

BAKER, P. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. **Microbes and infection**, v. 2, p. 1181-1192, 2000.

BIKLE, D. D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. Review. **American Journal of Medicine**, v. 103, p. 427-436. California, 1997.

BONE, H. G.; DOWNS, JR., R. W.; TUCCI, J. R.; HARRIS, S. T.; WEINSTEIN, R. S.; LICATA, A. A.; MCCLUNG, M. R.; KIMMEL, D. B.; GERTZ, B. J.; HALE, E.; POLVINO, W. J. Dose-response relationships for alendronate treatment in osteoporotic elderly women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 1, v. 82, 1997.

BURGUERA, B; HOFBAUER, L. C.; THOMAS, T.; GORI, F.; EVANS, G. L.; SUNDEEP KHOSLA, S.; RIGGS, B. L.; TURNER, R. T. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. **Endocrinology**, n.142, v. 8, p. 3546-3553, 2001.

COHEN, A. J.; ROE, F. J. C. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt. **Food and Chemical Toxicology**, n. 38, p. 237-253, 2000.

CORTET, B; MARCHANDISE, X. Bone microarchitecture and mechanical resistance, Review. **Joint Bone Spine**, n. 68, p. 297-305, 2001.

DEMPSTER, D. W.; LINDSAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **The Lancet**, v. 341, p. 797-801, 1993.

DEMPSTER, D. W.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; LINDSAY, R.; SHENI, V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone**, n. 1, v. 16, p. 157-161, 1995.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance, review. **Science**, v. 289, 2000.

ENRIORI, P. J.; ENRIORI, C. L. The pathogenesis of osteoporosis in older women and men: a review. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 82, p. 1-6, 2002.

FROST, H. M. Defining osteopenias and osteoporosis: Another View (With Insights from a New Paradigm). **Bone**, n. 5, v. 20, p. 385-391, 1997.

GALI, J. C. Osteoporose. **Revista Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, p. 53-62, 2001. (<http://www.osteoporose.med.br>)

GENNARI, L.; BECHERINI, L.; FALCHETTI, A.; MASI, L.; MASSART, F.; BRANDI, M. L. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. Review. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 81, p.1-24, 2002.

GILSANZ, V.; Phenotype and genotype of osteoporosis. **TEM**, n. 5, v. 9, 1998.

GOH, J. H. C.; SHAH, K. M.; BOSE, K. Biomechanical study on femoral neck fracture fixation in relation to bone mineral density. **Clinical Biomechanics**, n. 6, v. 10, p. 304-308, 1995.

HABERLAND, M.; SCHILLING, A. F.; RUEGER, J. M.; AMLING, M. Brain and bone: central regulation of bone mass. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, n. 12, v. 83-A, p. 1871-1876, 2001.

HARADA, S.; RODAN, G. A. control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, p. 349-355, 2003. (<http://www.nature.com/nature>)

HULLEY, P. A.; CONRADIE, M. M.; LAVELDIT, C. R.; HOUGH, F. S. Glucocorticoid-induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. **Bone**, n. 1, v. 31, p. 220-229, 2002.

JÄMSÄ, T.; TUUKKANEN, J.; JALOVAARA, P. Femoral neck strength of mouse in two loading configurations: method evaluation and fracture characteristics. **Journal of Biomechanics**, n. 31, p. 723-729, 1998.

JUNQUEIRA, P. A. A.; FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R.; ARIÊ, W. M. Y.; PINOTTI, J. A. **Osteoporosis**. 2000. (<http://www.usp.br/medicina>)

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgery Focus**, v. 10, 2001.

KARSENTY, G. The central regulation of bone remodeling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, n. 10, v. 11, p. 437-439, 2000.

LEDERMAN, R.; CARNEIRO, R. A. Osteoporose: saúde pública no Brasil. **ARS CVRANDI Clínica Médica**, v. 29, p. 17-24, 1996.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84-A, 2002.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A.; Glucocorticoid-induced osteoporosis. **TEM**, n. 3, v. 11, p. 79-85, 2000.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, n.2, v. 21, p. 115–137, 2000.

MARTIN, E. A.; RITMAN, E. L.; TURNER, R. T. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. **Bone**, n. 32, p. 261–267, 2003.

MAZZUOLI, G.; MARINUCCI, D.; D'ERASMO, E.; ACCA, M.; PISANI, D.; RINALDI, M. G.; BIANCHI, G.; DIACINTI, D.; MINISOLA, S. Cyclical behavior of bone remodeling and bone loss in healthy women after menopause: results of a prospective study. **Bone**, n. 6, v. 31, p. 718-724, 2002.

MCILWAIN, H. H.; Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Preventive Medicine**, n. 36, p. 243-249, 2003.

MOKESILDE, L.; DANIELSEN, C. C.; SOGAARD, C. H.; McOSKER, J. E.; WRONSKI, T. J. The anabolic effects of parathyroid hormone on cortical bone mass, dimensions and strength – assessed in a sexual mature, ovariectomized rat model. **Bone**, n. 2, v. 16, p. 223-230, 1995.

MUNDY, G. R. Pathogenesis of osteoporosis and challenges for drug delivery., **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 42, p. 165–173, 2000.

NORDIN, B. E. C. Calcium and osteoporosis. Review. **Nutrition**, n. 718, v. 13, p. 1-23, 1997.

NORDIN B. E. C.; NEED A. G.; MORRIS H. A.; HOROWITZ M.; CHATTERTON B. E.; SEDGWICK A. W. Bad habits and bad bones. In nutritional aspects of osteoporosis. **Challenges of Modern Medicine**, v. 7, p. 1-25, 1995.

ORTOFT, G; OXLUND H. Qualitative alterations of cortical bone in female rats after long-term administration of growth hormone and glucocorticoid. **Bone**, n. 6, v. 18, p. 581-590, 1996.

OTT, S. Osteoporosis and bone physiology. 1998.
(<http://uwcme.org/courses/bonephys>)

PAPATHANASOPOULOU, V. A.; FOTIADIS, D. I.; MASSALAS, C. V. A theoretical analysis of surface remodeling in long bones. **International Journal of Engineering Science**, v. 42, p. 395–409, 2002.

PEACOCK, M.; TURNER, C. H.; ECONS, M. J.; FOROUD, T. Genetics of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, n. 3, v. 23, p. 303–326, 2002.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology**. Washington, p. 274, 1992.

RIGGS, B. L; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Reviews**, n. 3, v. 23, p. 279–302, 2002 .

ROBBINS, S. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5. ed. RJ, Editora Guanabara, 1994.

ROSEN, C. J. Pathogenesis of osteoporosis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 2, v. 14, p. 181-193, 2000.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. **Histologia, Texto e Atlas**. Editora Panamericana. 2. ed. São Paulo, p. 799, 1993.

ROUX, C; ORIENTE, P; LAAN, R; HUGHES, R. A.; ITTNER, J.; GOEMAERE, S.; MUNNO, O.; POUILLE` S, J. M.; HORLAIT, S.; CORTET, B. Randomized trial of effect of cyclical etidronate in the prevention of corticosteroid-induced bone loss. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 4, v. 83, 1998.

RUBIN, M. R.; BILEZIKIAN, J. P. The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. Clinical review. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. 9, v. 87, p. 4033-4041, 2002.

SARIS, N. L.; MERVAALA, E.; KARPPANEN, H.; KHAWAJA, J. A.; LEWENSTAM, A. Magnesium, an update on physiological, clinical and analytical aspects. Review. **Clinica Chimica Acta**, v. 294, p. 1-26, 2000.

SATO, M.; VAHLE, J.; SCHMIDT, A.; WESTMORE, M.; SMITH, S.; E. ROWLEY, E.; MA, L. Y. Abnormal bone architecture and biomechanical properties with near-lifetime treatment of rats with PTH. **Endocrinology**, n. 9, v. 143, p. 3230-3242, 2002.

SEEMAN, E. The structural basis of bone fragility in men. **Bone**, n. 1, v. 25, p. 143-147, 1999.

SIETSEMA, W. K. Animal models of cortical porosity. **Bone**, n. 4, v. 17, p. 297-305, 1995.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes/Fisiologia dos Animais Domésticos**. Editora Guanabara Koogan S. A. 11. ed., Rio de Janeiro, p. 471-473, 1993.

TANIZAWA, T.; YAMAGUCHI, A.; UCHIYAMA, Y.; MIYAURA, C.; IKEDA, T.; EJIRI, S.; NAGAI, Y.; YAMATO, H.; MURAYAMA, H.; SATO, M.; T. NAKAMURA, T. Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. **Bone**, n.1, v. 26, p. 43-53, 2000.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, n. 4, v. 17, 1995.

THORNDIKE, E.A.; TURNER, A. In search of an animal model for postmenopausal diseases. In: **Frontiers in Bioscience**, n. 3, Colorado, Ft. Collins, p.17-26, 1998.

UDDO – Unidade de Diagnóstico e Densitometria Óssea, Osteoporose - Informações para Médicos, 2002. (www.uddo.com/osteoporose)

WANG, L.; BANU, J.; McMAHAN, C. A.; KALU, D. N. Male rodent model of age-related bone loss in men. **Bone**, n. 2, v. 29, p. 141-148. 2001.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 153-164, 2000.

WOOLF, A. D. Strong bones in later life. Bulletin of the World Health Organization. **The International Journal of Public Health**, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO/58. Osteoporosis: Both health organizations and individuals must act now to avoid an impending epidemic. **Information Office**, 1999.