

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

EFEITO DA SIMPATECTOMIA QUÍMICA SOBRE AS
VÉRTEBRAS DE RATAS OSTEOPÊNICAS INDUZIDAS PELA
OVARIECTOMIA

CHARLES CHENWEI WANG

SÃO CARLOS
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

EFEITO DA SIMPATECTOMIA QUÍMICA SOBRE AS
VÉRTEBRAS DE RATAS OSTEOPÊNICAS INDUZIDAS PELA
OVARIECTOMIA

CHARLES CHENWEI WANG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS
2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

W246es

Wang, Charles Chenwei.

Efeito da simpatectomia química sobre as vértebras de ratas osteopênicas induzidas pela ovariectomia / Charles Chenwei Wang. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

63 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Medicina experimental - rata. 2. Osso. 3. Ovariectomia. 4. Osteoporose. 5. Sistema nervoso autônomo. I. Título.

CDD: 619.93 (20ª)

Orientadora
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Aos meus pais Wang e Chou que, apesar da dificuldades, me deram educação, carinho, oportunidades, lições sobre a vida e apoio durante toda a minha formação pessoal e profissional.

Ao meu irmão Toni pelo apoio em todos os momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka pelas inúmeras oportunidades que me foram concedidos desde a minha iniciação científica e pelo exemplo a ser seguido de profissionalismo e competência;

Ao Sr. Sérgio Dias, técnico do laboratório de Neuroendocrinologia / DCF – UFSCar, pela amizade e que sempre esteve disposto a auxiliar nas partes práticas deste trabalho;

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar) para a utilização de equipamentos para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela utilização do leitor de micro placas (ELISA) do Laboratório de Histologia e Microscopia / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar;

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela amizade e contribuição direta e indiretamente para a realização deste trabalho;

Aos amigos presentes e ausentes do Laboratório de Neuroendocrinologia Adriana Edler Macagnan, Dernival Bertoncelo, Daniel Mochiutti, Edvanina de Souza Costa Queiroz, Fernando Talhari, Fernando Vidal D'Ávila, Inalda A. Bispo, Juciléia Barbosa Bezerra,

Lidiângela Dias Vilar, Lucélia Maria Albertin, Luciana Brondino, Luiz Carlos Paula Mello (*in memorian*), Patrícia Driusso, Valéria Gonçalves Albieri Mattos pelo carinho, amizade e apoio para a realização deste trabalho;

A Ana Carolina Elias Pedretti por estar ao meu lado nos momentos de alegria e tristeza, sempre me dando apoio;

Aos meus amigos do departamento que estiveram presentes em todos os momentos, em especial Laila e Eliane Oba.

Aos meus amigos Ângela, Daniel, Natacha, Sabrina, Ogata e Renato que me deram apoio e compartilharam comigo todos os momentos de alegria.

A todos os amigos que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao órgão de fomento CNPq pela concessão da bolsa.

RESUMO

A osteoporose é uma osteopatologia que atinge principalmente a mulheres após a menopausa, com graves conseqüências sociais e econômicas. Ela é caracterizada pela perda de massa óssea (osteopenia) seguida de alteração na microestrutura do tecido ósseo fazendo com que o indivíduo fique mais propenso a ter fraturas. A rata castrada é um modelo experimental de osteoporose bem aceito na literatura. O Sistema Nervoso Simpático (SNS) inerva o periósteo e seus neurotransmissores regulam diretamente e indiretamente o metabolismo ósseo. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do Sistema Nervoso Simpático sobre os parâmetros biométricos, biomecânico, físicos e bioquímicos da quinta vértebra lombar (L₅) de ratas ovariectomizadas (OVX). Para isso foram utilizadas ratas de 4 meses de idade divididas em 5 grupos: Basal (sacrificado no início do experimento), Intacto (Salina 0,9% s.c.), Controle (OVX+Salina 0,9% s.c.), GUA 30 (OVX+guanetidina 37mg/kg.dia s.c. durante 30 dias) e GUA 8 (OVX+guanetidina 40mg/kg.dia s.c. durante 8 semanas). Os animais foram sacrificados ao final de 8 semanas, exceto o grupo basal, e suas vértebras L₅ foram dissecadas de suas partes moles e submetidas a análises biométricas, biomecânica, físicas e químicas. O efeito da desnervação pela guanetidina foi observada através da ptose palpebral e diarreia em todos os animais tratados com guanetidina. O grupo Controle apresentou menores valores de densidade mineral e óssea do que o grupo intacto, que refletiu sobre a resposta biomecânica, indicando que a indução da osteopenia pela ovariectomia foi efetiva. A simpatectomia inibiu parcialmente o desenvolvimento da osteopenia, pois os parâmetros densidade mineral e óssea foram maiores em relação ao grupo Controle, porém estes parâmetros não refletiram sobre a propriedade biomecânica.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Simpático – Simpatectomia – Guanetidina – Osso – Rato.

Osteoporosis is a pathology that afflicts mainly postmenopausal women, consequently this disorder generates severe social and economic consequences. This disease is characterized by low bone mass (osteopenia) and bone tissue microarchitectural deterioration, which leads to enhanced bone fragility, thus resulting in fracture risk increase. As an experimental mode of bone loss in post-menopausal women the ovariectomized rat has been used. The periosteum is innervated by sympathetic nervous system (SNS) whose neurotransmitters regulate direct and indirectly the bone metabolism. In this study, we evaluated the possible influence of SNS on physical, biometric, biomechanical and biochemical parameters of the 5th lumbar vertebrae of ovariectomized (ovx) rats. Therefore, 4-month-old female rats were randomized in 5 groups: Basal (sacrificed at the beginning of the experimental), Intact (treated with 0,9% saline, sc), Control (ovx rats treated with 0,9% saline, sc), GUA 30 (ovx rats treated with 37 mg of guanetidina /kg, sc, for 30 days) and GUA 8 (ovx rats treated with 40 mg of guanetidina /kg, sc, for 8 weeks). The animals were sacrificed at the end of 8 weeks, except for the Basal group. The 5th lumbar vertebra was removed and defleshed and physical, biometric, biomechanical and chemical properties were analyzed. The denervation was confirmed by palpebral ptosis and diarrhea observed in all treated animals. The Control group showed lower mineral and bone densities than the Intact group with consequent lower biomechanical parameter, indicating that castration was effective to induce osteopenia. The sympathetic denervation partially inhibited the osteopenia as shown by the higher values of mineral and bone densities when compared with the Control group. But, these better physical parameters did not induced better bone quality as shown by biomechanics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Foto da máquina de ensaios universal Instron (modelo 4444) mostrando um teste de compressão de vértebra.....	23
FIGURA 2.	Representação do gráfico força-deformação obtido durante o teste de compressão.....	24
FIGURA 3.	Presença de ptose palpebral nas ratas tratadas com guanetidina.....	28
FIGURA 4.	Peso corporal inicial, peso corporal final, ganho de peso e altura das vértebras (L ₅) das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	30
FIGURA 5.	Força máxima obtida no teste biomecânico de vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	31
FIGURA 6.	Cálcio Plasmático e Cálcio e Fósforo ósseo de vértebras de ratas dos diferentes grupos experimentais.....	33
FIGURA 7.	Peso úmido, Peso imerso, Peso seco e Peso cinzas das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	35
FIGURA 8.	Volume, Densidade Óssea e Densidade Mineral das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	36
FIGURA 9.	Percentual de água, Percentual de Material Orgânico e Percentual de Material Mineral das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	37

LISTA DE TABELA

TABELA 1.	Pesos corporais (iniciais e finais), ganho de peso e altura das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais	30
TABELA 2.	Força máxima obtido com o teste biomecânico das vértebras das ratas dos grupos experimentais.....	31
TABELA 3.	Cálcio Plasmático e Cálcio e Fósforo ósseo de vértebras de ratas dos diferentes grupos experimentais.....	33
TABELA 4.	Peso úmido, peso imerso, peso seco, peso cinzas e volume das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	34
TABELA 5.	Densidade óssea, densidade mineral, percentual de água, percentual de material orgânico e mineral das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	34

LISTA DE ABREVIATURA

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BMD	Densidade mineral óssea
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
EPM	Erro padrão da média
GUA 30	Grupo castrado tratado durante 30 dias
GUA 8	Grupo castrado tratado durante 8 semanas
h	Altura dos corpos vertebrais
HRT	Terapia de reposição hormonal
kN	Kilo Newton
L ₅	Quinta vértebra lombar
MED	Média
N	Newton
n	Número de animais
NBR	Normas brasileiras
NO	Óxido nítrico
OVX	Ovariectomia
Pc	Peso cinzas
Pi	Peso imerso
Ps	Peso seco
PTH	Hormônio da paratireóide
Pu	Peso úmido
s.c.	subcutânea
S ₁	Primeira vertebral sacral
SDs	Desvios padrão
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
VIP	Polipeptídeo vasoativo
VO	Volume Ósseo
vs	Versus
ρ	Densidade da água

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Tecido ósseo e Osteoporose.....	10
1.2	Sistema Nervoso Simpático.....	14
1.3	Modelo experimental de osteoporose pós-menopausal.....	15
1.4	Utilização de Propriedades biomecânicas para inferir a Qualidade Óssea.....	17
1.5	Objetivo.....	18
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1	Animais.....	19
2.2	Protocolo experimental.....	19
2.3	Ovariectomia.....	20
2.4	Parâmetros estudados.....	20
2.4.1	Propriedades biométricas.....	20
2.4.2	Propriedades bioquímicas.....	21
2.4.3	Propriedade biomecânica do corpo vertebral (L ₅).....	21
2.4.4	Propriedades físicas do corpo vertebral (L ₅).....	25
2.5	Análise estatística.....	26
3.	RESULTADOS.....	28
3.1	Simpatectomia e Ovariectomia.....	28
3.2	Propriedades biométricas.....	29
3.3	Propriedade biomecânica.....	31
3.4	Propriedades bioquímicas.....	32
3.5	Propriedades físicas do corpo da vértebra (L ₅).....	34
4.	DISCUSSÃO.....	39
4.1	Simpatectomia.....	39
4.2	Parâmetros biométricos.....	39
4.3	Parâmetros bioquímicos.....	41
4.4	Parâmetros físicos e bioemcânico.....	42
5.	CONCLUSÕES.....	45
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	APÊNDICE.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo e Osteoporose

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado. Diferente do que muitos imaginam, ele é dinâmico e vital, que protege os órgãos e é necessário para manter a integridade mecânica necessária para a locomoção. Além disso, o tecido ósseo está intimamente associado a homeostase mineral, sendo o sítio primário da hematopoese (EINHORN, 1996).

Os ossos são compostos por materiais orgânicos, minerais (ou inorgânicos) e água. A parte orgânica tem muitas funções, dentre elas, determinar a estrutura e as propriedades mecânicas ósseas e é composta da matriz óssea e de células próprias do tecido ósseo. A matriz óssea é formada principalmente por colágeno tipo I e outras proteínas, fatores de crescimento e citoquinas, compondo 98% do material orgânico ósseo. Os 2% restantes são formados pelas células ósseas, os *osteoblastos*, responsáveis pela formação da matriz óssea, os *osteócitos*, que são osteoblastos não-funcionais que ficaram aprisionados pela matriz óssea mineralizada e os *osteoclastos* que são células multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea (EINHORN, 1996).

O tecido ósseo se organiza de modo a suportar os estresses mecânicos gerados pelas atividades normais. Essa função, além da manutenção da homeostase mineral, é mantida por um processo denominado *remodelação óssea*, que é um processo cíclico de formação e reabsorção óssea, que perdura por toda a vida do indivíduo (DEMPSTER, 1995).

Durante toda a vida, o tecido ósseo é constantemente remodelado em locais denominados de unidades de remodelação óssea. A massa óssea é mantida pelo equilíbrio do processo de remodelação óssea, que ocorre em várias unidades. Uma alteração neste processo, seja devido à diminuição da atividade osteoblástica ou aumento da atividade osteoclástica, resulta na diminuição da massa óssea (PARFITT, 1987). A formação estrutural do osso pode ser alterada conforme a remodelação óssea induzida por estresse mecânico (NOMURA; YAMAMOTO, 2000).

Quando os níveis de estrogênio estão diminuídos, há um desequilíbrio da remodelação, aumentando a atividade osteoclástica, ou seja, os osteoclastos formam lacunas profundas que não são completamente preenchidas pelos osteoblastos, diminuindo a massa óssea, como observado em mulheres pós-menopausadas (PARFITT, 1979). Estudos em animais sugerem que o estrógeno age alterando a produção e a atividade de fatores locais que regulam os precursores osteoblásticos e osteoclásticos (RAISZ, 1999).

A osteoporose tem sido definida como uma patologia caracterizada pela redução da massa óssea (osteopenia) e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, provocando um aumento da fragilidade óssea e conseqüentemente aumento do risco de fraturas (BURCKHARDT et al, 1991).

A Organização Mundial da Saúde, em 1994, com intuito de auxiliar a mensuração quantitativa para o diagnóstico clínico, sugeriu que valores de densidade mineral óssea (BMD) entre 1,1 a 2,5 desvios padrão (SDs) inferiores ao valor médio para adultos jovens normais indicam osteopenia. Seria considerada osteoporose quando a BMD de um adulto jovem normal estiver abaixo de 2,5 SDs do valor médio; e se acompanhado de uma ou mais fraturas poderia ser considerado um quadro de osteoporose estabelecida (PINTO NETO et al., 2002).

Há dois fatores que determinam o nível de massa óssea durante a maturidade, o pico de massa óssea atingido e a duração e a frequência de perdas ósseas que é a taxa de perda óssea (VÄÄNÄNEN, 1991). Indivíduos que alcançam maior pico de massa óssea durante a adolescência apresentam naturalmente uma maior proteção contra a diminuição da densidade óssea durante o envelhecimento, doenças ou quando a produção dos esteróides sexuais estiver diminuída (KLIBANSKI et al., 2001). O pico de massa óssea é atingido aproximadamente aos 35 anos de idade. Fatores genéticos, incluindo diferenças sexuais e raciais, e ambientais, como nutrição, exercício físico e modo de vida, podem influenciar o pico de massa óssea (VÄÄNÄNEN, 1991).

Além desses fatores, existem outros que aceleram a perda de massa óssea, tais como o alcoolismo, fumo, doenças crônicas como a cirrose, artrite reumatóide, tumores, imobilização prolongada, anorexia nervosa, uso excessivo de corticosteróides e anticonvulsivante (KAPLAN, 1995).

Marcus (1996) classificou a osteoporose em primária e secundária. É considerada primária quando a perda de massa óssea é devido a desordens do tecido ósseo, afetando assim mulheres pós-menopausadas e indivíduos de ambos os sexos em idade senil. A secundária refere-se à perda de massa óssea resultante de quadros clínicos específicos ou utilização de fármacos com conhecido efeito de reduzir a massa óssea.

Riggs e Melton (1983) propuseram o termo *osteoporose involucional* para designar a osteoporose ocorrida na idade adulta, em ambos os sexos. Estes mesmos autores subdividiram a osteoporose involucional em duas síndromes distintas, a osteoporose do *tipo I e tipo II*. O tipo I é do tipo pós-menopausal, portanto afetando apenas as mulheres e é caracterizado pelas fraturas em locais com predominância de tecido trabecular, tais como o corpo vertebral, antebraço distal e tornozelo. Nesse tipo de osteoporose involucional a perda da massa óssea deve à deficiência dos

hormônios gonadais que geram uma maior taxa de reabsorção óssea em relação à formação óssea. A osteoporose involucional do tipo II pode afetar tanto homens quanto mulheres, a partir dos 70 anos de idade. A perda da massa óssea nesse tipo de osteoporose se deve à disfunções do metabolismo, características do envelhecimento (formação óssea prejudicada, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais e de vitamina D). Esse tipo de osteoporose é caracterizado por fraturas em osso trabecular e cortical, sendo a fratura de quadril a mais típica.

A osteoporose é uma doença de grande impacto sócio-econômico que atinge todos os países, independentemente de serem desenvolvidos ou não. Dados oficiais recentes sobre a incidência de osteoporose na população brasileira são escassos, mas estudos evidenciam que a partir dos 50 anos de idade, 30% das mulheres e 13% dos homens sofrerão algum tipo de fratura devido à osteoporose ao longo da vida (PINTO NETO et al., 2002). Estudo realizado no Brasil em 1998 indicou que 94 120 pacientes sofreram fraturas vertebrais, 37 700 sofreram fraturas femurais e 37 700 sofreram fraturas de punho (CARNEIRO, 2001).

A osteoporose é uma patologia sistêmica e as fraturas vertebrais são complicações precoces e negligenciadas da doença, associadas à dor e invalidez, que podem ser importantes para prever o risco de fraturas futuras (LIPPUNER, 2003).

Muitas drogas tem sido estudadas a fim de se encontrar um agente terapêutico para a osteoporose. A *terapia de reposição hormonal* (HRT) tem sua eficiência já bem estabelecida, inclusive reduz os sintomas da menopausa e provavelmente a longo-prazo, diminui a incidência de doenças cardiovasculares. Porém, os efeitos colaterais, como o ganho excessivo de peso e o risco de câncer são preocupantes (WIMALAWANSA, 2000).

As drogas aprovadas para a prevenção e tratamento da osteoporose atuam, na maioria das vezes, como inibidores da reabsorção óssea, que incluem HRT, moduladores de receptores seletivos de estrógeno, calcitonina e bifosfonatos. As duas últimas drogas tem sido mostradas prevenindo fraturas. Outras drogas utilizadas incluem os andrógenos, PTH, flúor e doadores de NO. Wimalawansa (2000) sugere que o uso de terapia combinada promove efeito benéfico adicional, entretanto ainda deve ser elucidado.

Estudos utilizando-se doadores de óxido nítrico (NO), melatonina e flúor, em ratos castrados, tem tido resultados satisfatórios na prevenção contra os efeitos da castração sobre o tecido ósseo (BERTONCELLO, 2001; QUEIROZ, 2002; MACAGNAN, 2003; MELLO, 2003; VILLAR, 2004).

1.2 Sistema Nervoso Simpático

O sistema nervoso simpático, cujo principal neurotransmissor é a norepinefrina, prepara rapidamente o organismo para a defesa física (por luta ou fuga) frente a situações emergenciais, providencia suprimento sangüíneo com quantidades necessárias de oxigênio e nutrientes para músculos estriados e sistema nervoso central (SNC). É ela a responsável pela contração palpebral e pela contração dos esfíncteres intestinais.

Durante o crescimento corporal, o sistema nervoso simpático participa da regulação fisiológica óssea. O periósteo e o tecido ósseo são ricamente inervados por fibras sensoriais mielinizadas e amielinizadas do sistema nervoso simpático, as fibras sensoriais liberam o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e a substância P e as fibras simpáticas liberam o Polipeptídeo Vasoativo (VIP) e o neuropeptídeo Y

(CHERRUAU et al., 1999; CHERRUAU et al., 2003). Esses neuropeptídeos tem sido vistos como moduladores locais do metabolismo ósseo, influenciando o fluxo sanguíneo medular e periosteal, angiogênese e nocicepção, em adição a efeitos diretos sobre osteoblastos e osteoclastos (MADSEN et al, 1996).

Para se estudar a ação do sistema nervoso sobre determinados tecidos, são utilizados fármacos que causam a simpatectomia. Uma droga muito utilizada é a guanetidina, que é uma neurotoxina que age no sistema nervoso simpático pós-ganglionar causando uma simpatectomia farmacológica. Ela bloqueia a neurotransmissão, depleta o armazenamento e a recaptção de norepinefrina (NE), criando assim uma simpatectomia funcional

1.3 Modelo experimental de osteoporose pós-menopausal

Para o estudo da osteoporose experimental, utiliza-se um modelo experimental de perda óssea pós-menopausal *in vivo*, esse modelo pode ser definido como um animal vivo com perda óssea espontânea ou induzida devido à deficiência do hormônio ovariano, e as características da perda óssea e suas seqüelas se assemelham àquelas encontradas em mulheres pós-menopausadas em um ou mais aspectos. (KALU, 1991; FROST; JEE, 1992). Desta forma, o modelo experimental de osteoporose pós-menopausal pode não reproduzir exatamente as condições humanas, porém é útil para se estudar alguns aspectos da osteoporose, além de analisar o efeito de possíveis agentes terapêuticos (KALU, 1991).

A ovariectomia (OVX) em ratas é um modelo experimental de osteoporose pós-menopausal amplamente conhecido e difundido na literatura, pois mimetizam a perda

óssea pós-menopausal (KALU, 1991; FROST; JEE, 1992; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; THOMPSON et al., 1995; KIMMEL, 1996). Outros animais tem sido estudados dentre eles camundongos, aves, coelhos, cães, porcos, ovelhas e primatas (KIMMEL, 1996).

As principais características similares entre mulheres pós-menopausadas e ratas ovariectomizadas são: as taxas aumentadas do turnover ósseo com a reabsorção maior que a formação; uma fase inicial rápida de perda óssea seguida por uma fase mais lenta; maior perda de osso trabecular do que osso cortical; absorção intestinal de cálcio diminuída e alguma proteção contra a perda óssea pela obesidade (KALU, 1991).

A ovariectomia em roedores promove perda óssea, mas a deficiência do hormônio ovariano não resulta em fraturas como é observado em mulheres. Desta forma utiliza-se o termo osteopenia para definir a perda óssea induzida pela ovariectomia em ratas (KALU, 1991). Apesar de certas limitações, como a ausência do remodelamento haversiano e fraturas frágeis, o rato consiste em um bom modelo para a osteoporose humana, pois os mecanismos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea são semelhantes entre humanos e ratos, e o esqueleto de ambos reage similarmente a influências mecânicas, hormônios e drogas. Além disso, a utilização de ratas OVX representaria uma diminuição de aproximadamente 75% do tempo e 90% do custo comparados a estudos com cães e primatas. (FROST; JEE, 1992).

Kalu (1991) definiu *modelo de ratas maduras* baseado em ratas sexualmente maduras de 3 meses de idade, pois, segundo o autor, os efeitos da ovariectomia neste modelo manifestam-se em um mês ou menos e as características da perda óssea são muito semelhantes às encontradas em mulheres pós-menopausadas. Além disso, a análise do crescimento de ratas Wistar com seis meses de idade apresentou mudanças

mínimas da densidade e do conteúdo de cálcio do fêmur, demonstrando estabilidade esquelética.

Estudos realizados com ratas em crescimento (5 meses de idade) e idosas (19 meses de idade) mostraram que ratas jovens perdem material ósseo mais rapidamente do que animais mais velhos, indicando que ratas em crescimento são mais responsivas à deficiência de esteróides gonadais do que ratas idosas (THOMPSON et al., 1995).

A OVX é acompanhada por um aumento do ganho de peso corporal, que tende a suprir a perda do osso trabecular, provavelmente devido ao aumento da carga mecânica sobre o esqueleto (MILLER; BOWMAN; JEE, 1995).

1.4 Utilização de Propriedades biomecânicas para inferir a Qualidade Óssea

A densidade e força mecânica são importantes características quando se avalia o tecido ósseo (LIND et al., 2001). A FDA (Food and Drug Administration) sugere que se mensure não só a densidade óssea e marcadores bioquímicos do turnover ósseo, mas também a força óssea por teste biomecânico (KIMMEL, 1996).

A qualidade e a massa óssea são importantes para a manutenção da integridade esquelética durante o envelhecimento. A força mecânica é, provavelmente, o parâmetro mais importante relacionado ao risco de fratura. No rato, a osteopenia não predispõe à ocorrência de fraturas (PENG et al., 1994).

Quando os ossos são sujeitos a ensaios mecânicos, seu comportamento mecânico é dependente não só da massa do tecido ósseo, mas também de sua geometria e arquitetura (EINHORN, 1996). Sendo assim, a qualidade óssea pode ser inferida pela propriedade biomecânica. As propriedades biomecânicas são obtidas através de ensaios

biomecânicos específicos: para osso longo é aplicado o ensaio de flexão a três pontos; e para a vértebra o ensaio de compressão (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; PENG et al., 1994; KATSUMATA et al., 1995; LEPOLA et al., 1996; IKEDA et al., 2001).

A diminuição da capacidade da vértebra de suportar carga pode estar relacionada às suas propriedades materiais e à forma como estão estruturadas as trabéculas, devido à modificações dos processos pela perda óssea após a menopausa ou relacionada ao envelhecimento (EINHORN, 1996).

1.5 Objetivo

Analisar a possível participação do sistema nervoso simpático sobre a resposta do tecido ósseo de ratas à castração. Para tal, propriedades físicas, biomecânica e bioquímicas de vértebras de ratas simpatectomizadas pela guanetidina foram analisadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, com 4 meses de idade no início do experimento e peso corporal de 240 ± 10 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidas no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia/ DCF, em condições de luz e temperatura controlados (10 horas claro e 14 horas escuro, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$). Os animais foram alimentados com ração comercial (Primor®) e água não fluoretada à vontade.

Ao final do tratamento os animais foram sacrificados por decapitação. As vértebras foram retiradas e congeladas em salina 0,9% à -20°C até o momento anterior às análises.

2.2 Protocolo experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos:

- Basal: Animais sacrificados no início do experimento para a avaliação do crescimento corpóreo dos animais (KALU, 1991);

- Intactos: Animais intactos tratados com salina 0,9% (1ml/kg.dia – sc.) durante 8 semanas;

- Controle: Animais ovariectomizados tratados com salina 0,9% (1ml/kg.dia – sc.) durante 8 semanas;

- GUA 30: Animais ovariectomizados tratados com guanetidina (37mg/kg.dia – sc.) durante 30 dias;

- GUA 8: Animais ovariectomizados tratados com guanetidina (40mg/kg.dia – sc.) durante 8 semanas.

O tratamento dos animais iniciou-se 24 horas após a ovariectomia. Todos os animais dos grupos Intacto, Controle, Gua 30 e Gua 8 foram sacrificados ao final de 8 semanas a partir do início do tratamento.

2.3 Ovariectomia

As ratas dos grupos Controle, GUA 30 e GUA 8 foram ovariectomizadas aos 4 meses de idade, segundo a técnica descrita por Zarrow et al. (1964).

2.4 Parâmetros estudados

2.4.1 Propriedades biométricas

Peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente com o objetivo de acompanhar o crescimento e o estado de saúde dos animais.

Altura do corpo vertebral (L₅)

A altura (h) dos corpos vertebrais foi medida com auxílio de um paquímetro antes do ensaio biomecânico de compressão.

2.4.2 Propriedades Bioquímicas

Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral (L₅)

Após a obtenção do material mineral dos corpos vertebrais, estes foram solubilizados em ácido clorídrico 2N. Em seguida, os conteúdos de cálcio e fósforo foram determinados através de ensaio colorimétrico, utilizando-se de kits comerciais específicos Labtest®.

Conteúdo de Cálcio plasmático

O sangue coletado no dia do sacrifício foi centrifugado e seu plasma coletado, armazenado e congelado a -20°C. Momento anterior ao ensaio, o plasma foi descongelado e utilizado para determinar o conteúdo de cálcio através de ensaio colorimétrico, utilizando-se de kits comerciais específicos Labtest®.

2.4.3 Propriedade biomecânica do corpo vertebral (L_5)

Para a realização dos ensaios biomecânicos de compressão de vértebra, a quinta vértebra lombar (L_5) foi identificada e isolada tendo como referência a articulação da primeira vértebra sacral (S_1). Após esse processo ela foi dissecada de suas partes moles e os processos transversos, espinhosos e os arcos vertebrais retirados, obtendo somente o corpo da vértebra. As extremidades do corpo foram aplainadas a fim de se obter superfícies planas e paralelas.

Os ensaios de compressão foram realizados em uma máquina universal INSTRON modelo 4444 (Figura 1). Foi utilizada uma célula de carga de 1kN. Aplicou-se uma pré-carga de 10N para estabilizar e fixar o corpo da vértebra (SAMNEGÅRD; AKHTER; RECKER, 2001). A velocidade de aplicação da carga foi de 2 mm/min no sentido do eixo crânio-caudal (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; KATSUMATA et al. 1995; IKEDA et al., 2001) até o esmagamento parcial da vértebra (2/3 da altura da vértebra).

O ensaio foi registrado pelo software Instron Series IX, que gerou uma curva carga-deformação (Figura 2). Através desta curva obteve-se a *Carga máxima (N)*, que corresponde à maior carga suportada pela vértebra.



Figura 1. Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) demonstrando um teste de compressão da vértebra de rato. A: célula de carga de 1kN; B: haste com superfície plana; C: vértebra L₅; D: suporte com base plana; E: painel de controle.

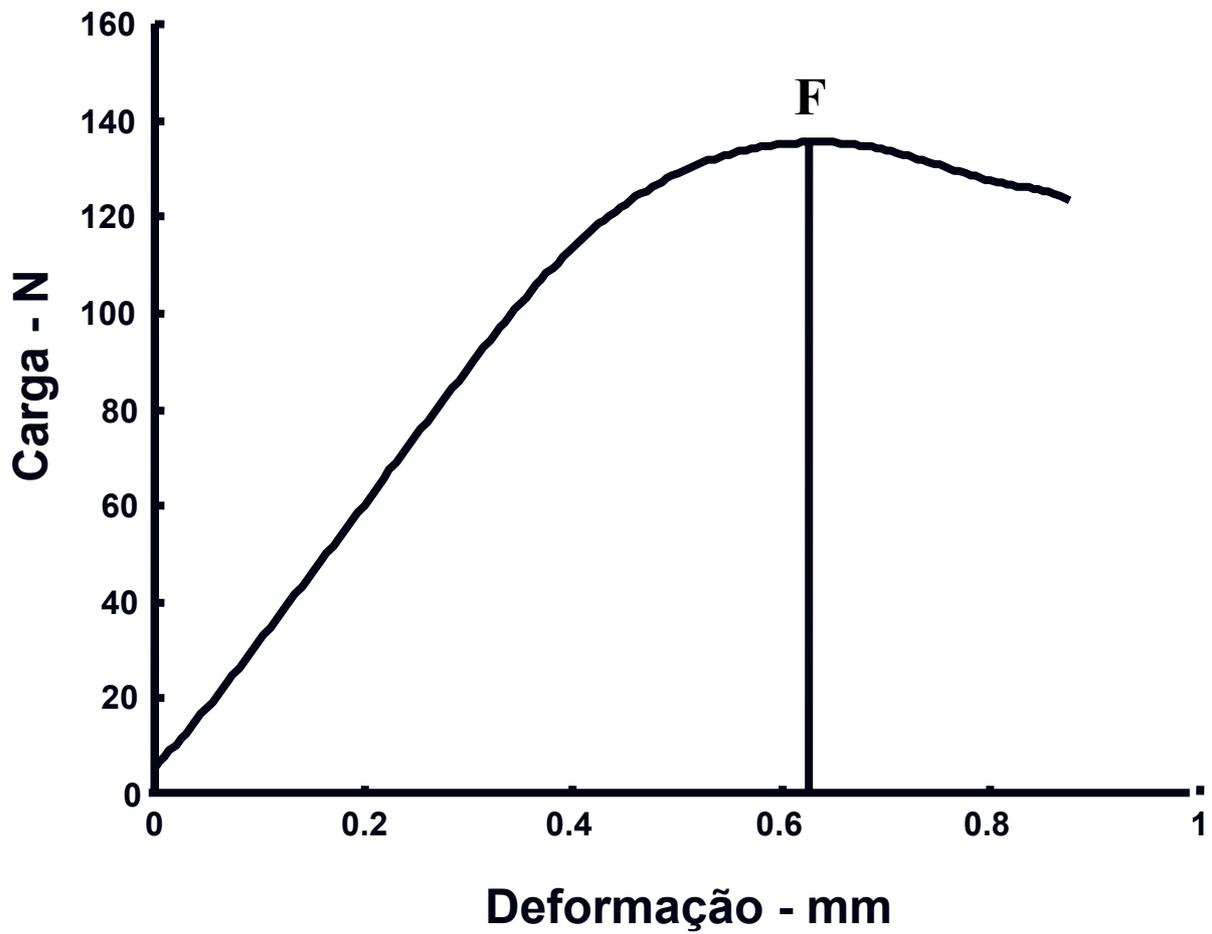


Figura 2. Representação da curva carga deformação obtida durante o ensaio biomecânico das vértebras de ratas. F: força máxima.

2.4.4 Propriedades físicas do corpo vertebral (L₅)

Os corpos vertebrais foram colocados em água destilada e levados ao dessecador por 24 horas para a retirada do ar dos poros ósseos. Após esse período obteve-se o peso imerso (P_i) e úmido (P_u). Essa pesagem foi realizada antes dos ensaios biomecânicos de compressão, pois o ensaio de compressão esmaga o corpo da vértebra, o que dificultaria essas pesagens.

Após os ensaios biomecânicos, os corpos vertebrais foram desidratados em estufa (Funbec) a 100°C por 24 horas obtendo-se o peso seco (P_s). Em seguida, os ossos foram levados à mufla para serem queimados a 800°C durante 24 horas, obtendo assim o peso das cinzas (P_c). Todas as pesagens foram realizadas em uma mesma balança eletrônica (Chyo).

Com base nos resultados obtidos, calculou-se o volume ósseo através do Princípio de Arquimedes e a partir desse resultado pode-se calcular a densidade óssea e mineral, percentuais de água, material orgânico e mineral dos corpos vertebrais segundo as seguintes fórmulas (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume Ósseo (VO)} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade Óssea} = \frac{P_u}{VO} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade Mineral} = \frac{P_c}{VO} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = 100x \frac{(P_u - P_s)}{P_u} \text{ (\%)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Material Orgânico} = 100x \frac{(Ps - Pc)}{Pu} (\%)$$

$$\text{Percentual Ósseo de Material Mineral} = 100x \frac{(pc)}{Pu} (\%)$$

Onde:

Pu – Peso do osso úmido (g)

Pi – Peso do osso imerso (g)

Ps – Peso do osso desidratado/seco (g)

Pc – Peso da cinza do osso (g)

ρ – Densidade da água (g/cm^3) = 1 g/cm^3

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos em cada grupo ($\text{MED} \pm \text{EPM}$), para cada parâmetro, foram comparados entre si através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, aplicado pelo software Instat 3.0, adotando um nível de significância $p < 0,05$.

Normas técnicas referentes à elaboração deste trabalho

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 10520 e NBR 6023 (2002).

As abreviaturas dos títulos das revistas utilizadas estão de acordo com a *Web of Science* e a obra *Serial Sources* publicada pelo BIOSIS, 1991.

3 RESULTADOS

3.1 Simpatectomia e Ovariectomia

Os animais tratados com Guanetidina apresentaram ptose palpebral (Figura 3) a partir do segundo dia de tratamento e persistiu durante as 8 semanas, tanto no grupo tratado durante 30 dias e como no grupo tratado durante 8 semanas, indicando a efetiva desnervação do sistema nervoso simpático pós-ganglionar. Além disso, os animais tratados com guanetidina apresentaram diarreia durante todo o tratamento.

Nas ratas ovariectomizadas foram observadas a atrofia uterina no dia do sacrifício, indicando a efetiva ovariectomia.

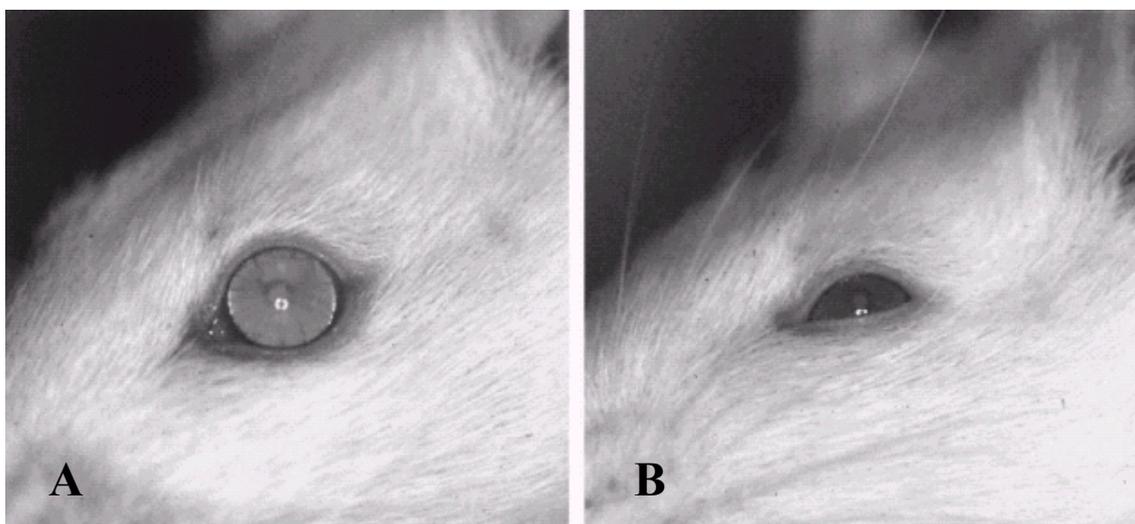


Figura 3 – A presença de ptose palpebral pode ser observada em ratas tratadas com Guanetidina durante todo o período do tratamento. (A) Sem tratamento com guanetidina; (B) Com tratamento com guanetidina; a ptose persistiu durante as 8 semanas do experimento.

3.2 Propriedades biométricas

A Tabela 1 e a Figura 4 apresentam os parâmetros biométricos dos animais (Peso inicial, Peso final, Ganho de peso) e a Altura do corpo vertebral.

Os pesos corporais iniciais dos animais não são diferentes entre os grupos. Os grupos Controle e GUA 30 apresentaram um maior ganho de peso corporal em relação ao grupo Intacto e GUA 8, que possuem a mesma idade.

A altura da vértebra do grupo basal foi menor do que de todos os outros grupos. Os grupos Intacto, Controle e GUA 30 não são diferentes entre si, porém o grupo GUA 8 apresentou uma média da altura menor que a do grupo GUA 30.

TABELA 1- Parâmetros biométricos dos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupos Experimentais	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de Peso (g)	Altura L ₅ (mm)
BASAL (11)	241,0 ± 5,78	--	--	6,1 ± 0,1
INTACTO (7)	249,4 ± 6,98	273,2 ± 8,12	23,8 ± 2,85	6,9 ± 0,1*
CONTROLE (9)	236,4 ± 0,84	301,0 ± 4,24 [@]	64,6 ± 4,92 [@]	7,0 ± 0,1*
GUA 30 (8)	244,1 ± 3,63	308,1 ± 3,87 [@]	64,0 ± 3,91 [@]	7,1 ± 0,1*
GUA 8 (8)	246,6 ± 4,77	281,5 ± 6,43 [#]	34,9 ± 6,78 [#]	6,7 ± 0,1* ^{\$}

(n) = número de animais. Média ± EPM. * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

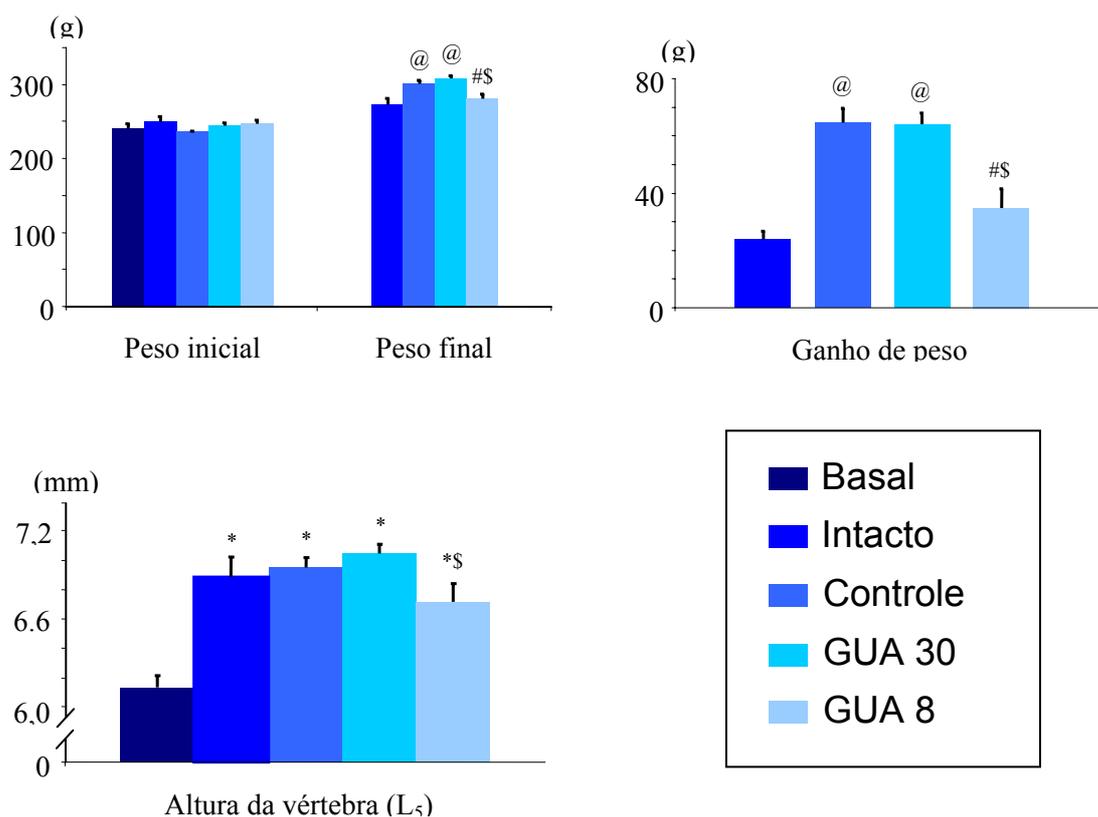


Figura 4 – Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Média ± EPM. p<0,05: * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

3.3 Propriedade biomecânica

A Tabela 2 e a Figura 5 apresentam os valores de força máxima suportada pelo corpo vertebral obtidos com o ensaio biomecânico.

O grupo Intacto comparado ao grupo Basal apresentou uma força máxima maior. O Grupo Controle obteve uma força muito menor do que a força suportada pelas vértebras dos animais do grupo Intacto. O Grupo GUA 30 e GUA 8 também apresentaram força máxima inferior em relação à força máxima obtida pelo grupo Intacto. Além disso, o grupo GUA 8 obteve um valor de força máxima menor que a dos animais do grupo GUA 30.

TABELA 2- Parâmetro biomecânico do corpo vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupo	(n)	Força Máxima (N)
Basal	11	106,0 ± 4,5
Intacto	9	152,5 ± 9,5*
Controle	7	98,8 ± 8,7 [@]
GUA 30	8	125,5 ± 9,5 [@]
GUA 8	8	90,9 ± 9,6 [@] ^{\$}

(n) = número de animais. Média ± EPM. * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

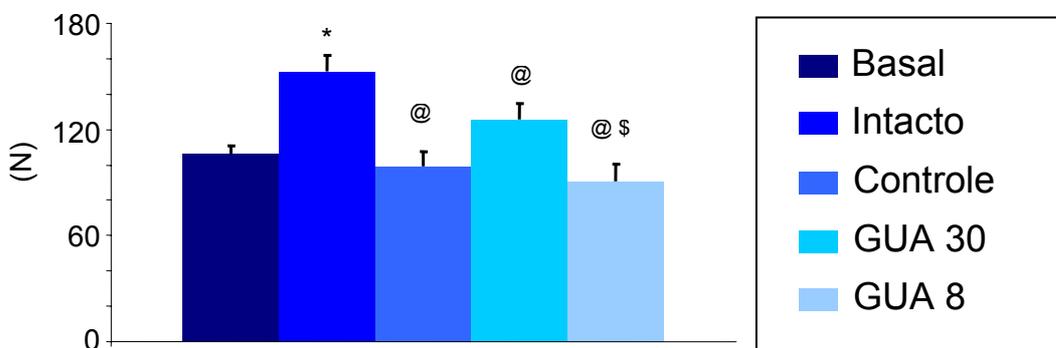


Figura 5 – Valores de Força Máxima obtidos com o ensaio biomecânico de corpos vertebrais de ratos dos diferentes grupos experimentais. Média ± EPM. * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

3.4 Propriedades bioquímicas

A Tabela 3 e a Figura 6 apresentam os valores de conteúdo de cálcio e fósforo do corpo vertebral e da concentração de cálcio plasmático dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Observa-se valores maiores de conteúdo de cálcio ósseo do grupo intacto e do grupo GUA 30 em relação ao grupo basal. O Grupo GUA 8 apresentou uma menor quantidade de cálcio ósseo em relação aos grupos Intacto e GUA30.

Em relação ao cálcio plasmático os grupos Intacto, Controle, GUA 30 e GUA 8 apresentaram valores menores de concentração de cálcio em relação ao grupo Basal. O grupo GUA 30 também apresentou menor concentração de cálcio em relação ao grupo Intacto.

O grupo Intacto apresentou uma maior quantidade de fósforo ósseo em relação ao grupo Basal e o grupo GUA 8 teve uma menor concentração de fósforo em relação aos grupos Basal, Intacto e Controle.

TABELA 3- Parâmetros bioquímicos dos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupo	(n)	Cálcio Plasmático (mg/dl)	Cálcio Ósseo (mg/vértebra)	Fósforo Ósseo (mg/vértebra)
Basal	11	10,22 ± 0,15	9,50 ± 0,27	4,6 ± 0,20
Intacto	9	9,23 ± 0,11*	12,71 ± 1,34*	5,6 ± 0,48*
Controle	7	9,00 ± 0,13*	10,66 ± 0,62	4,7 ± 0,22
GUA 30	8	8,85 ± 0,11* [@]	11,63 ± 0,83*	4,1 ± 0,56 [@]
GUA 8	8	8,89 ± 0,22*	9,45 ± 0,43 [@] ^{\$}	3,9 ± 0,23* [@] [#]

(n) = número de animais. Média ± EPM. * vs Basal; [@] vs Intacto; [#] vs Controle; ^{\$} vs GUA 30

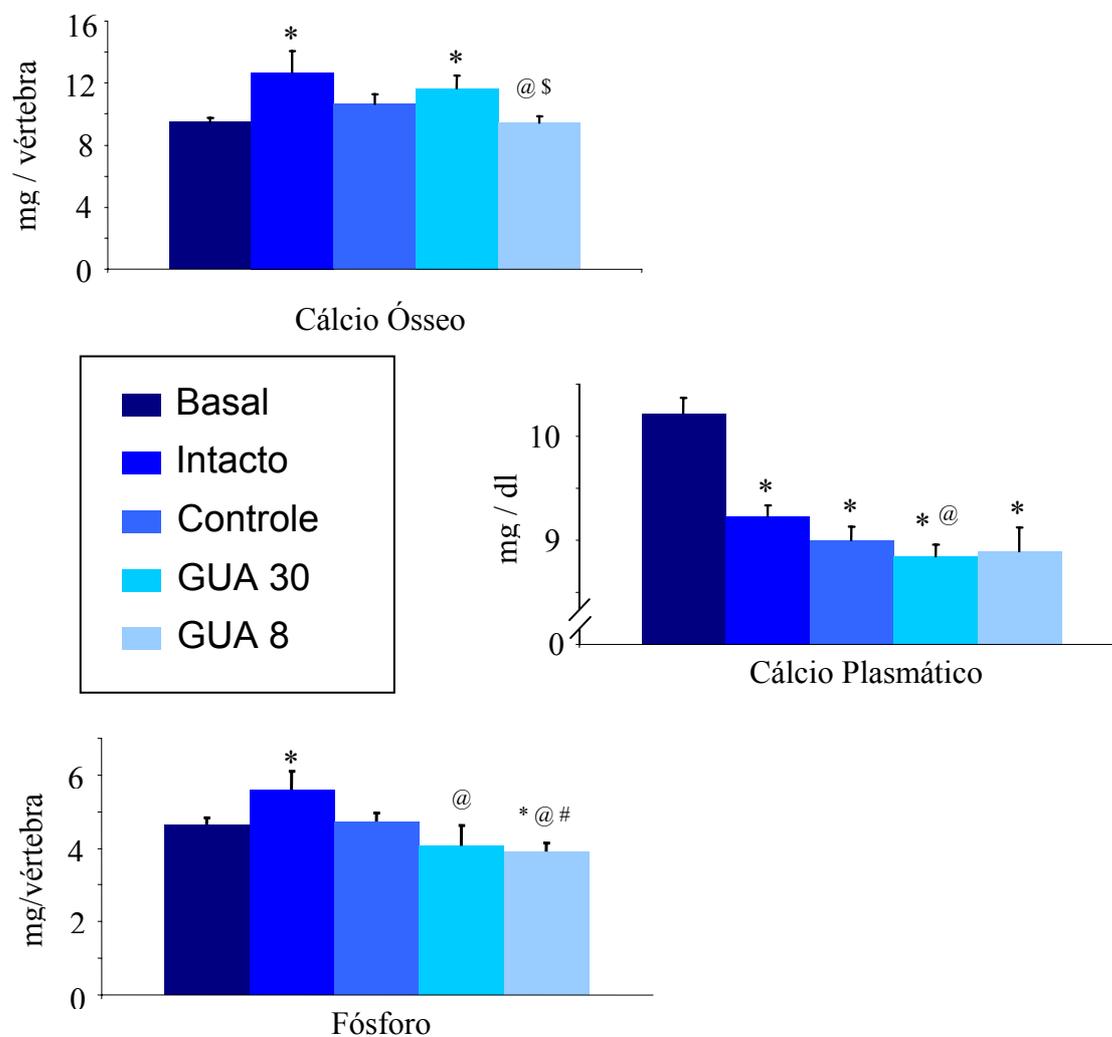


Figura 6 – Parâmetros bioquímicos das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Média ± EPM. * vs Basal; [@] vs Intacto; [#] vs Controle; ^{\$} vs GUA 30

3.5 Propriedades físicas do corpo da vértebra (L₅)

As Tabelas 4 e 5 e as Figuras 7, 8 e 9 apresentam os valores das propriedades físicas dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

TABELA 4- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais

Grupo	Peso úmido (g)	Peso imerso (g)	Peso seco (g)	Peso cinzas (g)	Volume (cm ³)
Basal	0,065 ± 0,002	0,016 ± 0,001	0,034 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,048 ± 0,001
Intacto	0,085 ± 0,004*	0,024 ± 0,002*	0,048 ± 0,002*	0,032 ± 0,002*	0,060 ± 0,003*
Controle	0,079 ± 0,003*	0,017 ± 0,001 [@]	0,040 ± 0,002* [@]	0,026 ± 0,001* [@]	0,062 ± 0,002*
GUA 30	0,086 ± 0,004*	0,026 ± 0,001* [#]	0,046 ± 0,002*	0,029 ± 0,001*	0,059 ± 0,003*
GUA 8	0,070 ± 0,002 ^{@#S}	0,021 ± 0,002* ^{#S}	0,039 ± 0,001* ^{@S}	0,024 ± 0,001 ^{@S}	0,049 ± 0,002 ^{@#S}

Média ± EPM. * vs Basal; [@] vs Intacto; [#] vs Controle; ^S vs GUA 30

TABELA 5- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais

Grupo	D. Óssea (g/cm ³)	D. Mineral (g/cm ³)	% de Água	% de Mat. Orgânico	% de Mat. Mineral
Basal	1,33 ± 0,01	0,47 ± 0,01	46,70 ± 1,33	17,74 ± 0,48	35,55 ± 0,89
Intacto	1,41 ± 0,03*	0,53 ± 0,02 *	42,69 ± 0,73*	19,85 ± 0,26*	37,46 ± 0,54
Controle	1,28 ± 0,01 [@]	0,42 ± 0,01* [@]	48,79 ± 0,84* [@]	18,49 ± 0,29 [@]	32,72 ± 0,63* [@]
GUA 30	1,44 ± 0,01* [#]	0,48 ± 0,01 [#]	46,52 ± 0,68 [@]	19,87 ± 0,39* [#]	33,60 ± 0,53* [@]
GUA 8	1,44 ± 0,02* [#]	0,50 ± 0,02 [#]	44,78 ± 1,48 [#]	20,74 ± 0,56* [#]	34,48 ± 0,96 [@]

Média ± EPM. * vs Basal; [@] vs Intacto; [#] vs Controle; ^S vs GUA 30

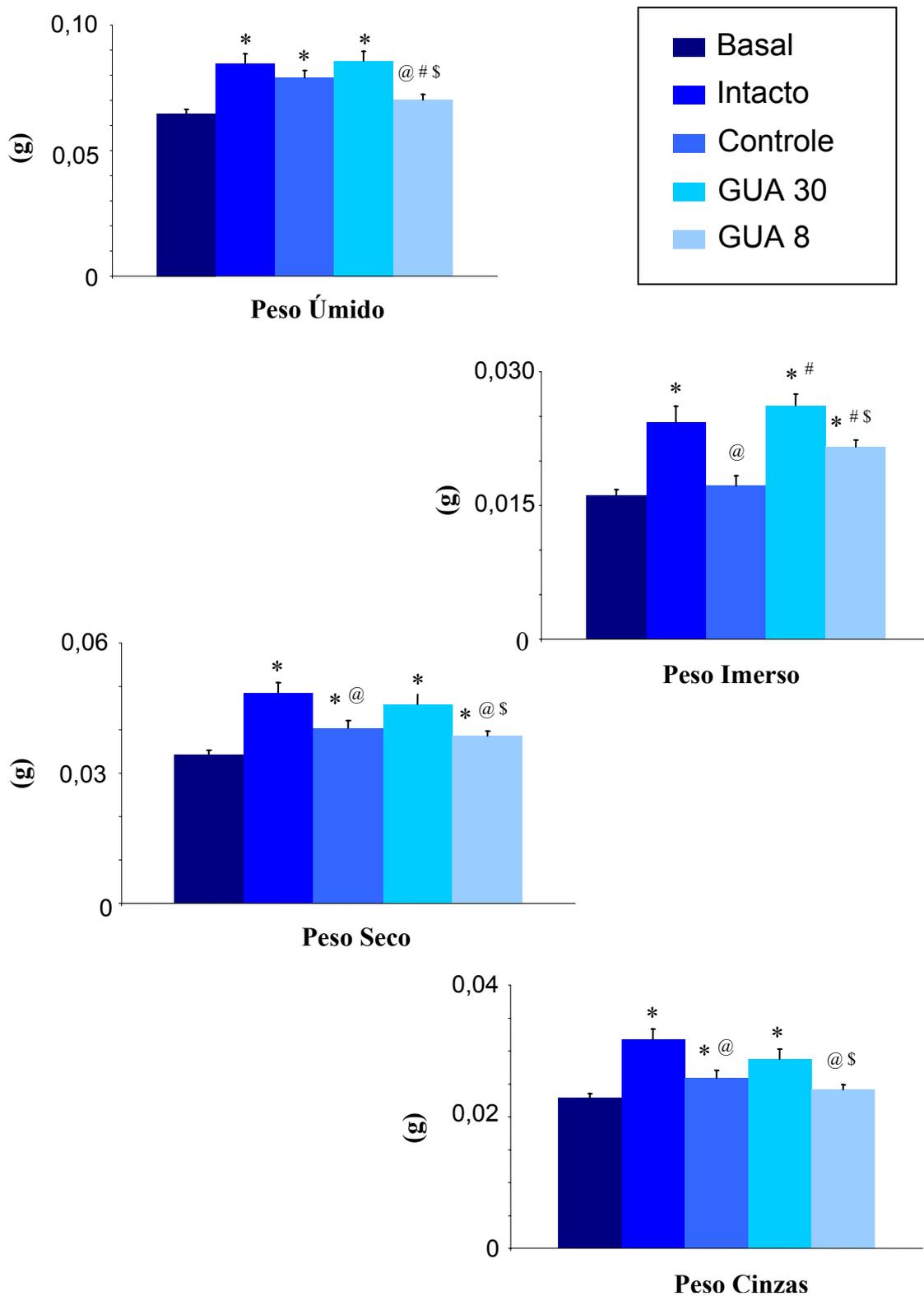


Figura 7 – Parâmetros físicos do corpo vertebral de ratas dos diferentes grupos experimentais. Média \pm EPM. * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

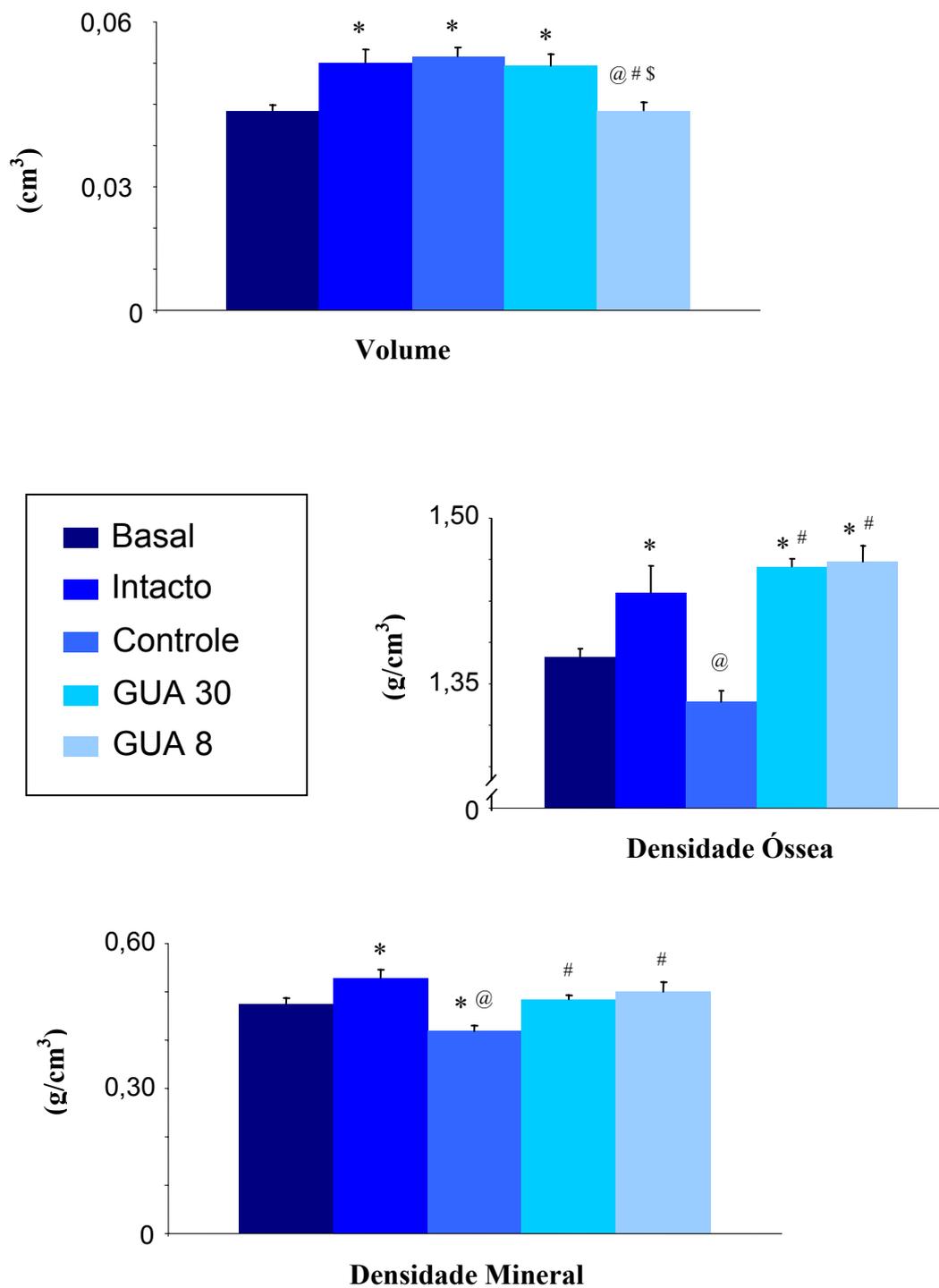


Figura 8 – Parâmetros físicos do corpo vertebral de ratas dos diferentes grupos experimentais. Média \pm EPM. * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

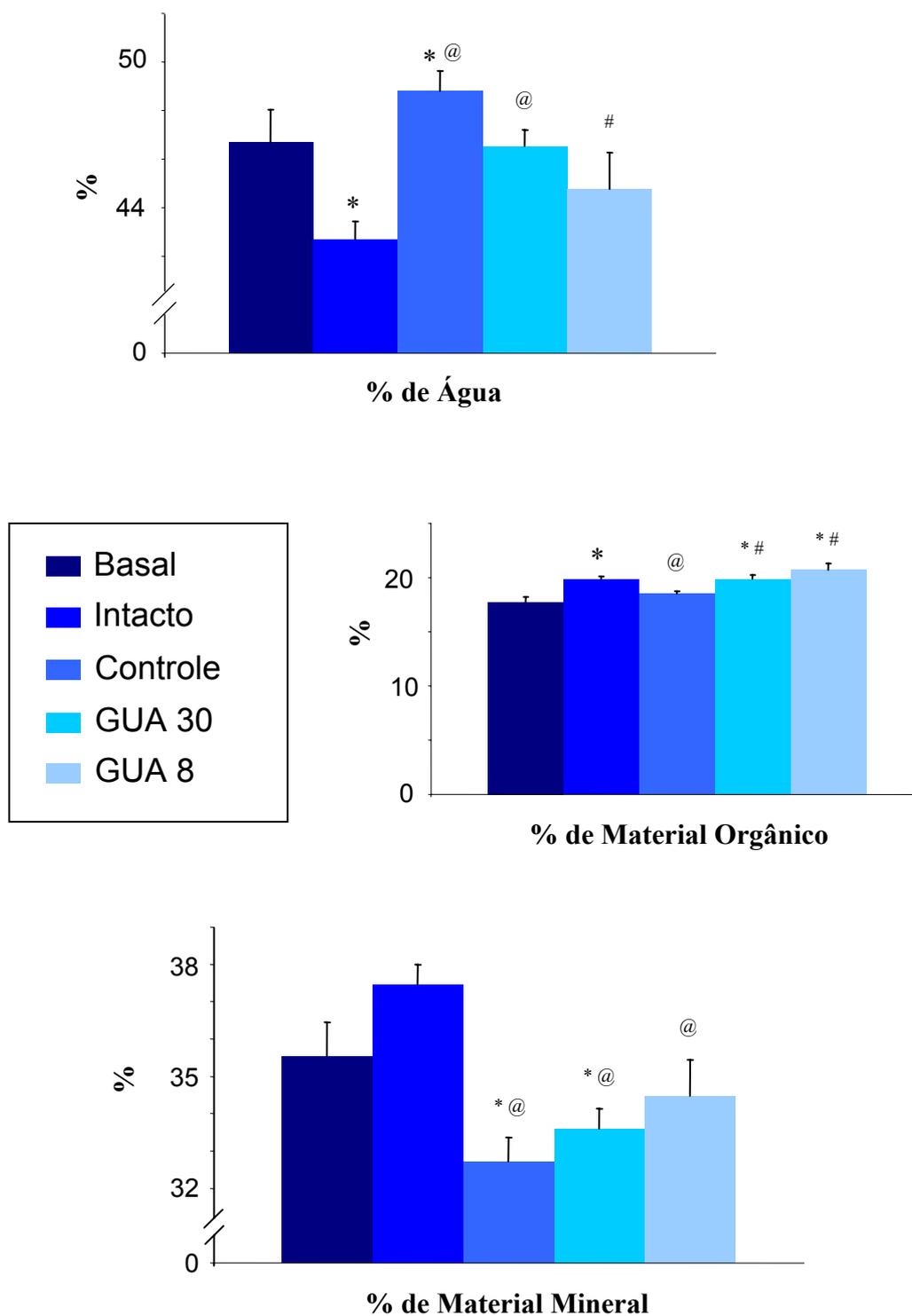


Figura 9 – Parâmetros físicos do corpo vertebral de ratas dos diferentes grupos experimentais. Média \pm EPM. * vs Basal; @ vs Intacto; # vs Controle; \$ vs GUA 30

O grupo Intacto apresentou os parâmetros peso úmido, peso imerso, peso seco, peso cinzas, volume, densidade mineral e óssea e percentual de material orgânico maiores e um percentual de água menor do que o grupo basal

Os animais do grupo Controle apresentaram os parâmetros peso imerso, peso seco, peso cinzas, densidade óssea e mineral e percentual de material orgânico e mineral menores do que o Grupo Intacto.

Os animais tratados com guanetidina durante 30 dias (GUA 30) apresentaram parâmetros, em sua maioria, semelhantes aos dos animais do grupo Controle, exceto os parâmetros peso imerso, densidade óssea e mineral e percentual de material orgânico, que foram maiores.

Comparando os grupos GUA 8 e Controle, os parâmetros peso úmido, volume e percentual de água foram menores e os parâmetros peso imerso, densidade óssea e mineral e percentual de material orgânico foram maiores. Quando comparados ao grupo Intacto, os parâmetros peso úmido, peso seco, peso cinzas, volume e percentual de material mineral do grupo GUA 8 menores. Comparando o grupo GUA 8 em relação ao grupo GUA 30, os parâmetros peso úmido, peso imerso, peso seco, peso cinzas e volume apresentam-se diminuídos.

4 DISCUSSÃO

4.1 Simpatectomia

As pálpebras são inervadas pelo sistema nervoso simpático pós-ganglionar e com a administração de guanetidina essa inervação é destruída quimicamente. A presença de ptose palpebral é um indicativo de que a desnervação foi efetiva (CHERRUAU et al, 1999; CHERRUAU et al, 2003).

Um dos efeitos colaterais da administração da guanetidina é a presença de diarreia, já descrita na literatura (HARDMAN et al., 1996). A presença de diarreia nos animais foi observada durante todo o período do tratamento e provavelmente os animais tratados com guanetidina ficaram debilitados devido à diarreia, principalmente os animais tratados durante 8 semanas.

4.2 Parâmetros biométricos

As ratas do grupo Controle, que foram ovariectomizadas (OVX), apresentaram um ganho de peso corporal maior que os animais do grupo Intacto durante o mesmo período. Esse aumento de peso corporal devido à OVX é relatado por outros autores (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; PENG et al., 1994; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; THOMPSON et al., 1995). O ganho acentuado de peso corporal das ratas OVX se deve ao aumento da quantidade de tecido adiposo, sem o ganho de massa magra desses animais (THOMPSON et al., 1995). Miller, Bowman e

Jee (1995) afirmam que o aumento do peso corporal pode ser devido ao mecanismo de compensação em relação à perda de massa óssea induzida pela ovariectomia, aumentando o estresse mecânico sobre os ossos.

O grupo GUA 30 apresentou ganho de peso maior que o grupo intacto, isso se deve ao fato dos animais desses grupos serem OVX e a administração de guanetidina não influenciam o ganho de peso do animal (SINGH; KLEIN; HERSKOVITS, 1981; HERSKOVITS; SINGH, 1984; DEMAS; BARTNESS, 2001; TRUJILLO; RIBONI, 2002). Os animais tratados durante 30 dias (GUA 30) apresentaram diarreia durante todo o período de tratamento e permaneceu durante até a 8^a. semana, mesmo o tratamento sendo suspenso no 30^o. dia, provavelmente em menor intensidade. Os animais tratados durante 8 semanas (GUA 8) também apresentaram diarreia durante todo o tratamento.

O grupo GUA 8 apresentou tendência de maior ganho de peso corporal, apesar de estatisticamente não diferente do grupo Intacto. Além disso, o ganho de peso é menor que o ganho dos grupos Controle e GUA 30, provavelmente a diarreia em maior intensidade devido ao tratamento prolongado, debilitando, assim, os animais.

Os grupos Intacto, Controle, Gua 30 e Gua 8 possuem a altura da vértebra maior do que a do grupo Basal, indicando que houve crescimento dos animais. Kalu (1991) preconiza que em ratos sexualmente maduro, aos 3 meses de idade, o crescimento ósseo não é mais acentuado como nos primeiros meses de vida, porém esse crescimento não cessa. Devido a esse fato, faz se necessário a inclusão de um grupo de animais sacrificados no início do experimento para servir como controle basal, evitando interpretações errôneas dos resultados. O grupo Controle não apresentou diferença de altura da vértebra em relação ao grupo Intacto. Nos animais tratados com guanetidina, GUA 30 e GUA 8, não foi observado nenhuma diferença da altura da vértebra em

relação ao grupo Controle, mostrando que o tratamento com a guanetidina não afeta a altura da vértebra. Os animais do grupo GUA 8 apresentaram menor altura da vértebra em relação ao grupo GUA 30, provavelmente devido ao crescimento debilitado pela administração da guanetidina em doses maiores por tempo mais longo.

4.3 Parâmetros bioquímicos

A diferença de conteúdo ósseo de cálcio e fósforo encontrado no grupo Basal em relação ao grupo Intacto se deve ao crescimento dos animais. A diminuição do cálcio plasmático e conseqüentemente o aumento de cálcio e fósforo ósseo se deve ao crescimento contínuo dos animais e maior formação óssea.

A ovariectomia não influenciou a concentração de cálcio plasmático, pois não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos ovariectomizados e o grupo intacto, como já descrita na literatura (ERBEN et al., 1996; HOCK et al, 1988; JIANG et al., 2005; KALU et al., 1989; KATSUMATA et al., 1995; MASON; MORRIS, 1997). A simpatectomia não tem influência sobre esse parâmetro, pois não foi observada nenhuma diferença entre os grupos simpatectomizados e o grupo controle, apesar do grupo GUA 30 apresentar uma redução significativa de cálcio plasmático em relação ao grupo Intacto.

Em relação ao conteúdo de cálcio ósseo, a ovariectomia não mostrou diferença significativa, apesar de apresentar uma tendência a diminuir em relação ao grupo Intacto. A simpatectomia parece ter efeito protetor contra a espoliação óssea, o que se pode observar no grupo GUA 30; porém com o uso prolongado da guanetidina, devido

aos seus efeitos colaterais, pode provocar uma diminuição acentuada de cálcio ósseo, como no grupo GUA 8.

O Fósforo ósseo tende a diminuir em animais castrados, apesar de não apresentarem diferença estatística. A simpatectomia juntamente com a ovariectomia diminui a quantidade de fósforo ósseo quando comparado ao grupo Intacto. Os animais tratados com guanetidina apresentam uma tendência a ter menor quantidade de fósforo em relação aos animais do grupo Controle. Quando a administração de guanitidina é prolongada, GUA 8, o efeito deletério é maior apresentando uma diminuição significativa em relação aos grupos Intacto, Controle e GUA 30.

4.4 Parâmetros físicos e biomecânico

A diferença observada quando se compara os parâmetros físicos e biomecânico dos grupos Basal e o grupo Intacto se deve ao crescimento contínuo do animal. Os parâmetros ósseos mensurados em modelos de ratas sexualmente maduras ovariectomizadas é semelhante ou até mesmo inferior aos animais do grupo basal (KALU, 1991). Mesmo o grupo Basal tendo os valores de peso úmido e peso das cinzas e volume menores que o grupo Controle, a proporção entre eles indica que o grupo Basal possui uma densidade mineral e percentual de material mineral maior e conseqüentemente um percentual de água menor que o grupo Controle, como preconizava Kalu (1991).

Os animais do grupo Controle, ovariectomizados, não apresentaram diferença de peso úmido e de volume, mas tiveram um peso imerso, peso seco e peso das cinzas menores que os animais do grupo Intacto. Esses parâmetros menores refletiram sobre a

menor densidade óssea e mineral, menor percentual de material mineral e orgânico e conseqüentemente maior percentual de água, indicando o desenvolvimento da osteopenia, onde há espoliação óssea enfraquecendo o tecido ósseo. Outros autores já relataram resultados semelhantes (AKHTER et al., 2003; BREITMAN et al., 2003; COXAM. et al, 1996; JIANG et al., 1995; KALU, 1991; KATSUMATA et al., 1995; NORDSLETTEN et al., 1994; PENG et al., 1994).

A ovariectomia promoveu a redução dos valores de força máxima dos corpos vertebrais dos animais dos grupos ovariectomizados, como já descrito na literatura (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; PENG et al., 1994; SAMMNEGÅRD; AKHTER; RECKER, 2001). Os animais do grupo Controle, ovariectomizados, apresentaram um baixo percentual mineral e orgânico e conseqüentemente um maior percentual de água, que diminuiu a densidade mineral e densidade óssea causando, assim, uma maior fragilidade óssea comprovada pela resposta biomecânica.

Os animais tratados com guanetidina apresentaram maior peso imerso em relação ao grupo Controle e o grupo GUA 8 apresentou, também, um menor peso úmido e volume, apesar do peso úmido e volume do grupo GUA 30 e os pesos seco e cinzas não serem diferentes do grupo Controle, a proporção entre eles resulta em menor espoliação óssea dos animais tratados com guanetidina, pois a densidade óssea e mineral e o percentual de material orgânico foram maiores que a dos animais ovariectomizados.

Singh, Klein e Herskovits (1981) observaram uma diminuição significativa da captação de Prolina- H^3 em cortes histológicos de fêmur e mandíbula de ratos machos tratados com guanetidina em relação aos animais controle, indicando que a atividade dos osteoblastos no grupo tratado está diminuído. Herskovits e Singh (1984)

observaram que houve diminuição da atividade dos osteoblastos e também observaram diminuição da atividade metabólica dos osteoclastos em cortes histológicos da diáfise femoral de ratos simpatectomizados mais velhos.

CHERRUAU *et al.*(1999) afirmam que o sistema simpático não estaria envolvido com o recrutamento dos precursores dos osteoclastos, mas tem um significativo efeito sobre a absorção devido à inibição da diferenciação dos pre-osteoclastos e da ativação dos osteoclastos. E sugerem que a depleção do mediador simpático possa perturbar a diferenciação osteoclástica. A simpatectomia perturba a comunicação osteoblasto-pré-osteoclástica, e que a diminuição do número e tamanho dos osteoclastos diminui a área erodida (CHERRUAU *et al.*, 2003).

Isto explicaria a menor espoliação óssea apresentada pelos animais dos grupos tratados com guanetidina, pois os animais tratados com guanetidina apresentaram um aumento da densidade óssea e mineral devido ao aumento do percentual de material orgânico e diminuição do percentual de água, apesar do grupo GUA 30 não ter se mostrado significativo em relação ao grupo Controle.

5 CONCLUSÃO

A análise dos parâmetros biomecânico, físicos e bioquímicos das vértebras lombares dos animais, permite concluir que:

- A presença de ptose palpebral e diarreia durante todo o período do experimento nos animais tratados com guanetidina indicaram que a simpatectomia foi efetiva.

- O sucesso da ovariectomia foi comprovada pela atrofia uterina e foi efetiva em promover osteopenia, pois os animais castrados apresentaram uma diminuição das densidades óssea e mineral que refletiram sobre a resposta biomecânica.

- A simpatectomia inibiu parcialmente a espoliação óssea, pois os grupos simpatectomizados apresentaram densidade maior que a do grupo controle e semelhante ao do grupo intacto, porém isso não refletiu sobre a resposta ao ensaio biomecânico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTER, M.P. et al. Effects of nicotine on bone mass and strenght in aged female rats.

J. Orthop. Res., v. 21, p, 14-19, 2003.

BERTONCELLO, D. **Efeitos do tratamento com melatonina sobre o tecido ósseo de ratos castrados**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

BREITMAN, P.L. et al. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strenght after ovariectomy compared to isoflavones alone. **Bone**, v33, p597-605, 2003.

BURCKHARDT, P. et al. Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. **Am. J. Med.**, v. 90, p. 107-110, 1991.

CARNEIRO, R.A. Epidemiological aspects of osteoporosis in Brazil. **Bone**, v.29, n.3, p.298, 2001.

CHERRUAU, M. et al. Chemical sympathectomy impairs bone resorption in rats: a role for the sympathetic system on bone metabolism. **Bone**, v25, p 545-551, 1999.

CHERRUAU, M. et al. Chemical sympathectomy-induced changes in TH-, VIP-, and CGRP-immunoreactive fibers in the rat mandible periosteum: influence on bone resorption. **J. Cell. Physiol.**, v.194, p.341-348, 2003.

COXAM, V. et al. Effects of Dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats. **Bone**, v.19, p.107-114, 1996.

DEMAS, G.E.; BARTNESS, T.J. Novel method for localized, functional sympathetic nervous system denervation of peripheral tissue using guanethidine. **J. Neurosci. Methods**. v.112, p.21-28, 2001.

DEMPSTER, D.W. Bone remodeling. In: RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. **Osteoporosis: etiology, diagnosis and management**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995. p.67-91.

EINHORN, T.A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 3-22.

ENGESAETER, L.B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop. Scand.**, v.49, p.512-518, 1978.

ERBEN, R.G. et al. Prophylatic effects of 1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃ on ovariectomy – Induced cancellous bone loss in the rat. **Calcif. Tiss. Int.** v.60, p.434-440, 1996.

FROST, H.M.; JEE, W.S.S.; On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. **Bone Miner.**, v. 18, p. 227-236, 1992.

HARDMAN, J.G. et al. Goodman & Gilman's: **The pharmacological basis of therapeutics**. Ninth edition. McGraw-Hill, 1996. 1 CD-ROM.

HERSKOVITS, M.S.; SINGH, I.J. Effect of guanethidine - induced sympathectomy on osteoblastic activity in the rat femur evaluated by ³H-proline autoradiography. **Acta Anat.** ,v.120, p. 151-155, 1984.

HOCK, J.M. et al. Human parathyroid hormone – (1,34) increase bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. **Endo**, v.122, p.2899-2904, 1988.

IKEDA, S. et al. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomized in rats. **Bone**, v.28, n.6, p.625-633, 2001.

JIANG, Y. et al. Femoral neck trabecular microstructure in ovariectomized ewes treated with calcitonin: MRI microscopic evaluation. **J. Bone Miner. Res.**, v.20, p.125-132, 2005.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.**, v.15, p.175-192, 1991.

KALU, D.N. et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v.124, p.7-16, 1989.

KAPLAN, F.S. Prevenção e tratamento da osteoporose. **Clin. Symp.**, v.47, n.1, p.3-38, 1995.

KATSUMATA, T. et al. Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v.10, n.6, p.921-931, 1995.

KIMMEL, D.B. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p.671-690.

KLIBANSKI, A. et al. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. **The J. Amer. Med. Assoc.**, v.285, n.6, p.785-795, 2001.

LEPOLA, V.T. et al. Long-term effects of clodronate on growing bone rat. **Bone**, v.18, n.2, p.191-196, 1996.

LIND, P.M. et al. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. **Bone**, v.29, n.3, p.265-270, 2001.

LIPPUNER, K. Medical treatment of vertebral osteoporosis. **Eur. Spine J.**, v.12, suppl.2, p.132-141, 2003.

MACAGNAN, A.E. **Efeito do óxido nítrico sobre o metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas**. 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MADSEN, J.E. et al. Neural involvement in post-traumatic osteopenia: An experimental study in the rat. **Bone**, v.18, n.5, p.411-416, 1996.

MARCUS, R. The nature of osteoporosis. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 647-659.

MARTIN, R.B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **J. Biomech.**, v.23, n.10, p.1021-1029, 1990.

MASON, R.A.; MORRIS, H.A. Effects of dihydrotestosterone on bone biomechanical markers in sham and oophorectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v.12, p.1431-1437, 1997.

MELLO, L.C.P. **Características físicas, químicas e biomecânicas dos ossos de ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio**. 2003. 108f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MILLER, S.C.; BOWMAN, B.M.; JEE, W.S.S. Available animal models of osteopenia – small and large. **Bone**, v. 17, p. 117-123; 1995.

MOSEKILDE, L.; DANIELSEN, C.C.; KNUDSEN, U.B. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. **Bone**, v.14, p.1-6, 1993.

NOMURA, S.; YAMAMOTO, T.T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biol.** v.19, p.91-96, 2000.

NORDSLETTEN, L. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. . **Calcif. Tiss. Int.** v.55, p.436-442, 1994.

PARFITT, A.M. Bone remodeling and bone loss: understanding the physiology of osteoporosis. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 30, p. 789-811, 1987.

PARFITT, A.M. Quantum concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis. **Calcif. Tiss. Int.** v.28, n.1, p.1-5, 1979.

PENG, Z. et al. The mechanical strenght of bone in diferent rat model of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, p. 523-532, 1994.

PINTO NETO A.M. et al. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.42, p.343-354, 2002.

QUEIROZ, E.S.C. **Efeito do óxido nítrico sobre a osteopenia induzida pela castração em ratos**. 2002. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clin. Chem.**, v.45, n.8(B), p.1353-1358, 1999.

RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. **Am. J. Med.**, v.76, p. 899-901, 1983.

SAMNEGÅRD, E.; AKHTER, M.P.; RECKER, R.R. Maintenance of vertebral body bone mass and strength created by human parathyroid hormone treatment in ovariectomized rats. **Bone**, v.28, n.4, p.414-422, 2001.

SEEMAN, E.; EISMAN, J.A. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. **Med. J. Aust.**, v.180, p.298-303, 2004.

SINGH, I.J.; KLEIN, R.M.; HERSKOVITS, M. Autoradiographic assessment of ³H-Proline uptake by osteoblast following guanethidine-induced sympathectomy in the rat. **Cell Tiss. Res.**, v.216, p.215-220, 1981.

THOMPSON, D.D. et al.. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.17, p.125-133, 1995.

TRUJILLO, A.; RIBONI, L. Effects of functional peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine on follicular development and ovulation of the adult female guinea pig. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.127, p.273-278, 2002.

VÄÄNÄNEN, H.K. Pathogenesis of osteoporosis. **Calcif. Tiss. Int.** v.49, suppl., p.11-14, 1991.

VILLAR, L.D. **Efeito do fluoreto de sódio sobre a qualidade óssea das vértebras lombares de ratas ovariectomizadas**. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

WIMALAWANSA, S. J. Prevention and treatment of osteoporosis: efficacy of combination of hormone replacement therapy with other antiresorptive agents. **J. Clinic. Densitomet.**, v.3, n.2, p.187-201, 2000.

ZARROW, M.X. et al. **Experimental endocrinology: a sourcebook basic techniques**. New York, Academic Press, p. 136-137, 1964.

APÊNDICE A – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOMECÂNICO E BIOQUÍMICOS – **GRUPO BASAL**

	PC ini (g)	PC final (g)	Altura (mm)	Fmáx (N)	Cálcio plasmático	Cálcio ósseo	Fósforo
	245	245	6,30	126,6	10,22	10,45	5,1
	229	229	6,50	124,7	9,95	10,32	4,9
	220	220	5,80	97,3	10,10	8,43	4,2
	251	251	5,95	109,0	11,30	9,57	4,7
	247	247	6,50	105,4	9,51	9,80	6,3
	271	271	5,75	101,7	10,55	8,74	3,8
	262	262	6,10	108,6	10,23	8,38	4,6
	212	212	6,05	75,4	10,44	8,47	4,2
	251	251	6,50	89,8	9,54	10,60	4,6
	216	216	5,85	111,2	10,40	9,18	4,1
	247	247	6,15	116,5	10,23	10,56	4,6
n	11	11	11	11	11	11	11
MED	241,0	241,0	6,1	106,0	10,22	9,5	4,6
DP	19,18	19,18	0,28	14,90	0,49	0,90	0,67
EPM	5,784	5,784	0,086	4,493	0,15	0,272	0,203

APÊNDICE B – PARÂMETROS FÍSICOS – GRUPO BASAL

	Pimerso (g)	Púmido (g)	Pseco (g)	Pcinza (g)	V.Ósseo (cm ³)	D.Óssea (g/cm ³)	D.Mineral (g/cm ³)	% Água	%MO	% MM
	0,0215	0,0723	0,0384	0,0248	0,0508	1,4232	0,4882	46,8880	18,8105	34,3015
	0,0163	0,0661	0,0371	0,0251	0,0498	1,3273	0,5040	43,8729	18,1543	37,9728
	0,0140	0,0557	0,0307	0,0202	0,0417	1,3357	0,4844	44,8833	18,8510	36,2657
	0,0164	0,0654	0,0335	0,0225	0,0490	1,3347	0,4592	48,7768	16,8196	34,4037
	0,0155	0,0666	0,0345	0,0229	0,0511	1,3033	0,4481	48,1982	17,4174	34,3844
	0,0177	0,0748	0,0309	0,0209	0,0571	1,3100	0,3660	58,6898	13,3690	27,9412
	0,0147	0,0630	0,0340	0,0229	0,0483	1,3043	0,4741	46,0317	17,6190	36,3492
	0,0126	0,0544	0,0294	0,0195	0,0418	1,3014	0,4665	45,9559	18,1985	35,8456
	0,0160	0,0648	0,0358	0,0238	0,0488	1,3279	0,4877	44,7531	18,5185	36,7284
	0,0160	0,0642	0,0368	0,0247	0,0482	1,3320	0,5124	42,6791	18,8474	38,4735
	0,0168	0,0640	0,0365	0,0246	0,0472	1,3559	0,5212	42,9688	18,5938	38,4375
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
MED	0,0161	0,0647	0,0343	0,0229	0,0485	1,3323	0,4738	46,6998	17,7454	35,5549
DP	0,0023	0,0060	0,0030	0,0020	0,0043	0,0346	0,0421	4,4331	1,5936	2,9582
EPM	0,0007	0,0018	0,0009	0,0006	0,0013	0,0104	0,0127	1,3366	0,4805	0,8919

APÊNDICE C – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOMECÂNICO E BIOQUÍMICOS – GRUPO INTACTO

	PC ini (g)	PC final (g)	Altura (mm)	Fmáx (N)	Cálcio plasmático	Cálcio ósseo	Fósforo
	222	251	6,30	125,0	8,94	11,45	5,1
	283	308	7,70	193,2	9,49	23,30	9,4
	249	264	6,90	163,7	9,18	11,77	5,8
	258	299	7,40	137,8	9,32	10,97	5,2
	278	300	6,95	121,2	9,21	10,80	4,9
	249	277	6,90	190,5	9,15	12,04	5,1
	229	241	6,50	155,8	9,95	12,42	4,9
	245	268	6,85	166,1	9,00	10,76	4,8
	232	251	6,75	119,5	8,82	10,89	5,1
n	9	9	9	9	9	9	9
MED	249,4	273,2	6,9	152,5	9,23	12,7	5,6
DP	20,95	24,35	0,42	28,42	0,34	4,01	1,45
EPM	6,982	8,117	0,141	9,474	0,11	1,338	0,485

APÊNDICE D – PARÂMETROS FÍSICOS – GRUPO INTACTO

	Pimerso (g)	Púmido (g)	Pseco (g)	Pcinza (g)	V.Ósseo (cm ³)	D.Óssea (g/cm ³)	D.Mineral (g/cm ³)	% Água	%MO	% MM
	0,0185	0,0741	0,0419	0,0270	0,0556	1,3327	0,4856	43,4548	20,1080	36,4372
	0,0318	0,1131	0,0650	0,0434	0,0813	1,3911	0,5338	42,5287	19,0981	38,3731
	0,0205	0,0789	0,0467	0,0304	0,0584	1,3510	0,5205	40,8112	20,6591	38,5298
	0,0196	0,0869	0,0458	0,0299	0,0673	1,2912	0,4443	47,2957	18,2969	34,4074
	0,0181	0,0792	0,0450	0,0292	0,0611	1,2962	0,4779	43,1818	19,9495	36,8687
	0,0281	0,0844	0,0511	0,0339	0,0563	1,4991	0,6021	39,4550	20,3791	40,1659
	0,0303	0,0895	0,0506	0,0333	0,0592	1,5118	0,5625	43,4637	19,3296	37,2067
	0,0282	0,0817	0,0479	0,0312	0,0535	1,5271	0,5832	41,3709	20,4406	38,1885
	0,0242	0,0736	0,0422	0,0272	0,0494	1,4899	0,5506	42,6630	20,3804	36,9565
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MED	0,0244	0,0846	0,0485	0,0317	0,0602	1,4100	0,5290	42,6916	19,8490	37,4593
DP	0,0054	0,0120	0,0070	0,0050	0,0093	0,0970	0,0520	2,1909	0,7818	1,6149
EPM	0,0018	0,0040	0,0023	0,0017	0,0031	0,0323	0,0173	0,7303	0,2606	0,5383

APÊNDICE E – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOMECÂNICO E BIOQUÍMICOS – **GRUPO CONTROLE**

	PC ini (g)	PC final (g)	Altura (mm)	Fmáx (N)	Cálcio plasmático	Cálcio ósseo	Fósforo
	241	287	7,10	60,0	8,81	9,04	4,2
	236	289	6,85	124,3	8,84	12,07	5,3
	237	300	6,85	94,0	9,31	11,86	4,6
	235	308	6,90	79,5	9,50	8,52	3,8
	234	320	7,20	115,0	8,64	9,81	4,9
	236	303	6,75	101,6	8,66	10,53	4,8
	236	300	7,25	117,1	9,26	12,81	5,4
n	7	7	7	7	7	7	7
MED	236,4	301,0	7,0	98,8	9,00	10,7	4,7
DP	2,23	11,22	0,20	22,94	0,35	1,63	0,58
EPM	0,841	4,243	0,074	8,669	0,13	0,617	0,220

APÊNDICE F – PARÂMETROS FÍSICOS – GRUPO CONTROLE

	Pimerso (g)	Púmido (g)	Pseco (g)	Pcinza (g)	V.Ósseo (cm ³)	D.Óssea (g/cm ³)	D.Mineral (g/cm ³)	% Água	%MO	% MM
	0,0123	0,0706	0,0340	0,0212	0,0583	1,2110	0,3636	51,8414	18,1303	30,0283
	0,0204	0,0858	0,0459	0,0297	0,0654	1,3119	0,4541	46,5035	18,8811	34,6154
	0,0183	0,0806	0,0392	0,0254	0,0623	1,2937	0,4077	51,3648	17,1216	31,5136
	0,0159	0,0725	0,0385	0,0243	0,0566	1,2809	0,4293	46,8966	19,5862	33,5172
	0,0153	0,0745	0,0381	0,0244	0,0592	1,2584	0,4122	48,8591	18,3893	32,7517
	0,0180	0,0763	0,0407	0,0264	0,0583	1,3087	0,4528	46,6579	18,7418	34,6003
	0,0204	0,0925	0,0468	0,0296	0,0721	1,2829	0,4105	49,4054	18,5946	32,0000
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	0,0172	0,0790	0,0405	0,0259	0,0617	1,2782	0,4186	48,7898	18,4921	32,7181
DP	0,0029	0,0079	0,0045	0,0030	0,0054	0,0348	0,0311	2,2242	0,7573	1,6824
EPM	0,0011	0,0030	0,0017	0,0011	0,0021	0,0131	0,0117	0,8407	0,2862	0,6359

APÊNDICE G – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOMECÂNICO E BIOQUÍMICOS – **GRUPO GUA 30**

	PC ini (g)	PC final (g)	Altura (mm)	Fmáx (N)	Cálcio plasmático	Cálcio ósseo	Fósforo
	253	320	7,25	180,5	9,04	12,56	5,5
	254	326	7,10	110,6	8,45	15,48	6,7
	232	295	7,10	95,5	8,92	11,91	4,6
	243	298	6,75	121,5	8,45	7,70	3,0
	226	309	6,95	119,3	8,69	9,76	1,7
	244	313	7,10	106,8	9,19	13,31	2,8
	252	303	7,35	147,8	8,77	11,53	4,3
	249	301	7,05	121,7	9,25	10,81	4,0
n	8	8	8	8	8	8	8
MED	244,1	308,1	7,1	125,5	8,85	11,6	4,1
DP	10,27	10,93	0,18	26,89	0,31	2,34	1,60
EPM	3,632	3,866	0,064	9,508	0,11	0,826	0,564

APÊNDICE H – PARÂMETROS FÍSICOS – GRUPO GUA 30

	Pimerso (g)	Púmido (g)	Pseco (g)	Pcinza (g)	V.Ósseo (cm ³)	D.Óssea (g/cm ³)	D.Mineral (g/cm ³)	% Água	%MO	% MM
	0,0304	0,0918	0,0510	0,0305	0,0614	1,4951	0,4967	44,4444	22,3312	33,2244
	0,0329	0,1094	0,0591	0,0375	0,0765	1,4301	0,4902	45,9781	19,7441	34,2779
	0,0245	0,0841	0,0439	0,0270	0,0596	1,4111	0,4530	47,8002	20,0951	32,1046
	0,0238	0,0811	0,0416	0,0264	0,0573	1,4154	0,4607	48,7053	18,7423	32,5524
	0,0229	0,0738	0,0397	0,0256	0,0509	1,4499	0,5029	46,2060	19,1057	34,6883
	0,0245	0,0796	0,0402	0,0250	0,0551	1,4446	0,4537	49,4975	19,0955	31,4070
	0,0276	0,0885	0,0488	0,0312	0,0609	1,4532	0,5123	44,8588	19,8870	35,2542
	0,0232	0,0765	0,0423	0,0270	0,0533	1,4353	0,5066	44,7059	20,0000	35,2941
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	0,0262	0,0856	0,0458	0,0288	0,0594	1,4418	0,4845	46,5245	19,8751	33,6004
DP	0,0037	0,0113	0,0067	0,0042	0,0078	0,0264	0,0247	1,9284	1,1082	1,4897
EPM	0,0013	0,0040	0,0024	0,0015	0,0028	0,0093	0,0087	0,6818	0,3918	0,5267

APÊNDICE I – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOMECÂNICO E BIOQUÍMICOS – GRUPO GUA 8

	PC ini (g)	PC final (g)	Altura (mm)	Fmáx (N)	Cálcio plasmático	Cálcio ósseo	Fósforo
	241	259	6,10	49,7	9,23	9,64	3,5
	258	294	6,45	104,5	8,34	10,05	3,6
	232	265	6,60	72,0	9,73	7,39	3,1
	251	283	6,95	75,7	9,07	8,86	3,5
	264	272	7,35	108,9	8,12	10,29	4,8
	245	273	6,80	91,8	8,14	9,87	3,7
	257	315	7,00	85,2	8,91	8,29	4,1
	225	291	6,65	139,2	9,62	11,23	4,9
n	8	8	8	8	8	8	8
MED	246,6	281,5	6,7	90,9	8,90	9,5	3,9
DP	13,49	18,17	0,38	27,15	0,64	1,22	0,65
EPM	4,769	6,425	0,134	9,600	0,22	0,430	0,230

APÊNDICE J – PARÂMETROS FÍSICOS – GRUPO GUA 8

	Pimerso (g)	Púmido (g)	Pseco (g)	Pcinza (g)	V.Ósseo (cm ³)	D.Óssea (g/cm ³)	D.Mineral (g/cm ³)	% Água	%MO	% MM
	0,0198	0,0615	0,0359	0,0222	0,0417	1,4748	0,5324	41,6260	22,2764	36,0976
	0,0231	0,0698	0,0378	0,0236	0,0467	1,4946	0,5054	45,8453	20,3438	33,8109
	0,0183	0,0620	0,0350	0,0214	0,0437	1,4188	0,4897	43,5484	21,9355	34,5161
	0,0209	0,0694	0,0374	0,0233	0,0485	1,4309	0,4804	46,1095	20,3170	33,5735
	0,0238	0,0764	0,0418	0,0260	0,0526	1,4525	0,4943	45,2880	20,6806	34,0314
	0,0212	0,0798	0,0388	0,0242	0,0586	1,3618	0,4130	51,3784	18,2957	30,3258
	0,0206	0,0710	0,0374	0,0238	0,0504	1,4087	0,4722	47,3239	19,1549	33,5211
	0,0248	0,0711	0,0447	0,0284	0,0463	1,5356	0,6134	37,1308	22,9255	39,9437
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	0,0216	0,0701	0,0386	0,0241	0,0486	1,4472	0,5001	44,7813	20,7412	34,4775
DP	0,0022	0,0063	0,0032	0,0022	0,0053	0,0544	0,0571	4,1943	1,5763	2,7286
EPM	0,0008	0,0022	0,0011	0,0008	0,0019	0,0192	0,0202	1,4829	0,5573	0,9647