

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**Efeitos da prolactina sobre a massa
óssea de ratas ovariectomizadas**

Patricia Driusso

São Carlos - SP
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Efeitos da prolactina sobre a massa óssea de ratas ovariectomizadas

Orientadora: Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka

Orientada: Patricia Driusso

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, com ênfase em Ciências Fisiológicas.

São Carlos - SP
2003

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

D781ep

Driusso, Patricia.

Efeitos da prolactina sobre a massa óssea de ratas ovariectomizadas / Patricia Driusso . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Medicina experimental - rata. 2. Osteoporose. 3. Prolactina. 4. Massa óssea. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Orientadora
Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka

“Quando descobri as respostas para o mundo, mudaram-se as perguntas”.

Autor desconhecido

Dedico este trabalho...

... ao meu grande amor Alessandro, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos

... aos meus pais, Valter e Sandra, pelo amor, dedicação, incentivo e principalmente, pelo exemplo

AGRADECIMENTO

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

À Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka, pela orientação nesse trabalho. Minha mais profunda admiração ao exemplo de profissionalismo e competência. Obrigada pela oportunidade!

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, pelo auxílio no desenvolvimento deste estudo, especialmente ao Sr Sérgio Dias;

À Prof^a Dr^a Cecília Helena de Azevedo Gouveia por conceder a utilização do densitômetro do Laboratório de Estrutura e Função Celular/ ICB III - USP;

À Prof^a Dr^a 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 do espectrofotômetro;

À Prof^a Dr^a Marisa Narciso Fernandes pela utilização do leitor de micro placas (ELISA) do Laboratório de Histologia e Microscopia/Departamento de Ciências Fisiológicas - UFSCar;

Ao Prof Dr José Antunes Rodrigues pela realização da dosagem de prolactina no Laboratório de Fisiologia Endócrina/Departamento de Fisiologia/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP;

Aos professores Dr^a Tânia de Fátima Salvini/Departamento de Fisioterapia - UFSCar, Dr^a Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte/Departamento de Educação Física e Motricidade Humana - UFSCar e Dr Antônio Renzi/Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP pelas valiosas contribuições no exame de qualificação;

Aos (ex e atuais) pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia Adriana Adler Macagnan, Charles Chenwei Wang, Dernival Bertencello, Edvanina de Sousa Costa Queiroz, Inalda Aparecida Bispo, Lidiângela Dias Villar, Lucélia Maria Albertin, Luiz Carlos Paula Mello e Valéria Gonçalves Albieri Mattos, pela ajuda e/ou amizade, contribuindo de maneira indispensável à realização desse trabalho;

Ao Prof Dr Jorge Oishi, pela amizade e ajuda permanente durante todos esses anos;

Aos amigos, Ana Claudia Muniz Rennó, Marcelo Tavella Navega, Valéria Ferreira, Luciana Brondino e Ricardo Ferrari pela amizade compartilhada, mesmo à distância;

Aos meus irmãos Fabiana Driusso e Marcelo Driusso pelo carinho e amizade;

Aos meus sogros Wilson Roberto Henrique Gomes e Gerceli Zito Gomes pelo grande apoio;

Ao Prof Marcus Vinicius Gava, coordenador do curso de fisioterapia da Universidade Metodista de São Paulo (UMESP) e ao Prof Dr Paulo Heraldo Costa do Valle, diretor do curso de fisioterapia da Universidade Cidade de São Paulo (UNICID), pelo grande incentivo à realização desse trabalho;

Aos professores e amigos, André Luis Maierá Radl/UMESP, Letícia Maria Pires Acaccio/UMESP e Marina Goto/UNICID, por me apoiarem nas vezes em que precisei abdicar das aulas em detrimento dessa pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Tabela	i
Lista de Figura	ii
Lista de abreviatura	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Osteoporose	2
1.1.1. Fisiopatogenia	3
1.1.2. Diagnóstico e tratamento	5
1.1.3. Perspectivas futuras do tratamento da osteoporose	6
1.2. Prolactina	7
1.2.1. Controle da secreção de prolactina	7
1.2.2. Ações biológicas da prolactina	10
1.2.2.1. Reprodução	10
1.2.2.2. Homeostase	11
1.2.2.3. Tecido Ósseo	12
2. OBJETIVO	13
2.1. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODO	14
3.1. Protocolo Experimental	14
3.2. Dosagem de prolactina	16
3.3. Variáveis estudadas	16
3.3.1. Peso corporal	16
3.3.2. Ensaio mecânico de flexão a três pontos	17
3.3.3. Comprimento e diâmetro (maior e menor) do fêmur	20
3.3.4. Propriedades físicas do fêmur	20
3.3.5. Parâmetros bioquímicos sérico e do fêmur	21
3.3.6. Densitometria óssea da tíbia	21
3.4. Análise estatística	22
3.5. Normas metodológicas	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Propriedades Biométricas	24
4.1.1. Peso Corporal	24
4.1.2. Comprimento e diâmetros (maior e menor) do fêmur	27
4.2. Propriedades biomecânicas do fêmur	30
4.3. Propriedades físicas ósseas do fêmur	33
4.4. Parâmetros bioquímicos sérico e do fêmur	42
4.5. Densitometria óssea da tíbia	47
4.6. Correlação entre prolactina e demais parâmetros	50

5. DISCUSSÃO	51
5.1. Propriedades biométricas do fêmur	51
5.2. Propriedades biomecânicas do fêmur	53
5.3. Propriedades físicas do fêmur	55
5.4. Densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo do fêmur e da tíbia	56
5.5. Parâmetros bioquímicos sérico e do fêmur	61
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICE	76

LISTA DE TABELA

TABELA 1.	Dosagem de prolactina (Média \pm EPM)	16
TABELA 2.	Peso corporal (PC) inicial, final e variação do peso corporal dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	24
TABELA 3.	Parâmetros biométricos do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	27
TABELA 4.	Parâmetros biomecânicos do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	30
TABELA 5.	Propriedades físicas do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	33
TABELA 6.	Parâmetros físicos do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM).....	36
TABELA 7.	Propriedades minerais e orgânicas do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	39
TABELA 8.	Concentrações séricas de cálcio, fósforo e atividade da fosfatase alcalina das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	42
TABELA 9.	Conteúdo de cálcio e fósforo do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)	45
TABELA 10.	Valores da densidade mineral óssea (BMD), do conteúdo mineral ósseo (BMC) e da área da tíbia direita das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM).....	47
TABELA 11.	Correlação linear entre os níveis de prolactina e demais parâmetros analisados	50

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1.	Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) demonstrando um teste de flexão a três pontos em um fêmur de rato. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria	18
FIGURA 2.	Representação do gráfico força-deformação obtido durante o teste de flexão a três pontos do fêmur de ratos. Estão representadas as definições das propriedades mecânicas analisadas neste estudo. Rigidez (inclinação da reta), força máxima e capacidade de absorver energia (área sombreada).....	19
FIGURA 3.	Variação do peso corporal das ratas dos diferentes grupos experimentais	25
FIGURA 4.	Evolução da média do peso corporal, expresso em gramas, das ratas dos diferentes grupos experimentais	26
FIGURA 5.	Comprimento do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	28
FIGURA 6.	Diâmetro maior do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	28
FIGURA 7.	Diâmetro menor do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	29
FIGURA 8.	Força máxima do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	31
FIGURA 9.	Rigidez do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	31
FIGURA 10.	Capacidade de absorção de energia do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	32
FIGURA 11.	Peso do fêmur direito imerso em água das ratas dos diferentes grupos experimentais	34
FIGURA 12.	Peso úmido do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	34
FIGURA 13.	Peso seco do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	35
FIGURA 14.	Peso das cinzas do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	35
FIGURA 15.	Volume ósseo do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	37

FIGURA 16. Densidade óssea do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	37
FIGURA 17. Densidade mineral do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	38
FIGURA 18. Conteúdo ósseo de água do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	40
FIGURA 19. Porcentagem de material orgânico do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	40
FIGURA 20. Percentual ósseo de material mineral do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais	41
FIGURA 21. Concentração sérica de cálcio das ratas dos diferentes grupos experimentais	43
FIGURA 22. Concentração sérica de fósforo das ratas dos diferentes grupos experimentais	43
FIGURA 23. Atividade da fosfatase alcalina sérica das ratas dos diferentes grupos experimentais	44
FIGURA 24. Conteúdo de cálcio do fêmur das ratas dos diferentes grupos experimentais	46
FIGURA 25. Conteúdo de fósforo do fêmur das ratas dos diferentes grupos experimentais	46
FIGURA 26. Densidade mineral óssea da tíbia das ratas dos diferentes grupos experimentais	48
FIGURA 27. Conteúdo mineral ósseo da tíbia das ratas dos diferentes grupos experimentais	48
FIGURA 28. Área da tíbia das ratas dos diferentes grupos experimentais	49

LISTA DE ABREVIATURA

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise de variância
BCT	bromocriptina
BMC	conteúdo mineral ósseo
BMD	densidade mineral óssea
Ca ⁺²	cálcio
DA	dopamina
DEXA	densitometria duo-energética
EPM	erro padrão da média
FSH	hormônio folículo estimulante
GABA	ácido gama-aminobutírico
GnRH	hormônio liberador das gonadotropinas
HiperPRL	hiperprolactinemia
HipoPRL	hipoprolactinemia
LH	hormônio luteinizante
M	média
n	tamanho da amostra
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVX	ovariectomia
P	peso do osso úmido
PC	peso corporal
Pi	peso do osso imerso em água
PIF	fator de inibição da prolactina
PKC	proteína Kinase C
Pm	peso do material mineral
PRF	fator de liberação da prolactina
PRL	prolactina
Ps	peso seco
PTH	hormônio paratireóideo
RIA	radioimunoensaio
TIDA	sistema tuberoinfundibular dopaminérgico
TRH	hormônio de liberação de tireotrofina
TSH	hormônio tireo-estimulante
ρ	densidade da água

RESUMO

Efeitos da prolactina sobre a massa óssea de ratas ovariectomizadas

A prolactina (PRL) desempenha uma grande diversidade de ações biológicas em muitas espécies de vertebrados. Além dos bem conhecidos efeitos sobre a reprodução, lactação e comportamento maternal, diversos estudos têm demonstrado os efeitos da PRL sobre o transporte de minerais, e mais recentemente sobre o metabolismo do cálcio e tecido ósseo. A PRL parece exercer um efeito no osso agindo direta ou indiretamente. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos da PRL sobre a massa óssea de ratas Wistar ovariectomizadas (ovx), por meio da análise de parâmetros físicos, biomecânicos e bioquímicos do fêmur, bioquímico sérico e da densitometria óssea da tíbia. As ratas tinham 4 meses de idade no início do estudo, e foram divididas em: grupo basal, grupo hiperPRL (intacta, ovx+sham e ovx+implante de 2 hipófises na cápsula renal) e grupo hipoPRL (intacta+salina, ovx+salina e ovx+ 3 mg/Kg de bromocriptina). Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e nos casos significantes, o teste de Duncan para discriminar as diferenças. A ovx promoveu maior ganho de peso corporal e crescimento ósseo associado. Observou-se que o grupo ovx+hipófise apresentou uma diminuição significativa dos valores dos parâmetros força máxima e rigidez, em relação ao grupo intacta, e ainda uma diminuição significativa dos parâmetros densidade óssea, densidade mineral e porcentagem de material mineral do fêmur em relação ao grupo ovx+sham. O grupo ovx+bromocriptina apresentou um aumento significativo em relação à força máxima, rigidez e volume ósseo do fêmur direito e do conteúdo mineral óssea da tíbia quando comparado aos grupos ovx+salina e basal. A diminuição dos níveis de PRL tornou os parâmetros biomecânicos referentes às ratas ovx estatisticamente iguais aos dos animais intactos, indicando uma ação protetora contra o efeito osteopênico promovido pela ovariectomia.

Palavras-Chave: osteoporose experimental, rata, prolactina, massa óssea

ABSTRACT

Prolactin's effects in the bone mass of the rats ovariectomy

Prolactin (PRL) has a great number of biologic functions in many species. Beyond the well known effects on reproduction, lactation and maternal behavior, many studies have showed the effects of PRL on the mineral transportation, calcium metabolism and bone. PRL seems to have an effect on the bone, acting direct or indirectly. The aim of this study was to investigate the effects of the PRL on bone mass of female ovariectomized (ovx) Wistar rats, through physical, biomechanical and biochemical analysis of the femur, biochemical of serum and densitometry of the tibia. The rats had 4 months of age in the beginning of the study and were divided in 3 groups: basal group, hiperPRL group (intact, ovx+sham e ovx + 2 grafted anterior pituitary under the kidney capsule) and hipopRL group (intact+saline, ovx+saline and ovx rats treated with bromocriptina-3 mg/Kg). Statistical analysis of results was performed by a two way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student Duncan test. The ovx promoted the higher weight gain and bone growth. It was observed that the ovx+hipofise group showed a significant decreased in maximum force and stiffness when compared with the intact group, and a significant decreased in the densitometry, mineral bone density and percentage of mineral material of the femur when compared with the ovx+sham group. The ovx+bromocriptine group showed a significant increase in maximum force, stiffness and bone volume of the right femur and the bone mineral content of the tibia when compared with the ovx+saline and basal groups. The lack of the PRL maintains the biomechanical parameters of the ovx rats statistically equal to the intact animals, showing a protective action of the PRL against the osteopenic effect promoted by ovariectomy.

Palavras-Chave: experimental osteoporosis, rats, prolactin, bone mass

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose encontra-se entre as maiores causas de morbidade e mortalidade entre os idosos, e sua incidência aumenta acompanhando a tendência demográfica etária da população mundial e seu respectivo aumento da expectativa de vida. As conseqüências clínicas da osteoporose tornaram-na um dos maiores problemas de Saúde Pública da atualidade, com enormes repercussões sociais e econômicas, provocando grande impacto na qualidade de vida e grau de independência dos indivíduos acometidos.

Ocorre predominantemente em mulheres após a menopausa e em número menos expressivo em homens com idade superior a 80 anos (YBARRA, ADE e ROMEO, 1996). WARD (1995) afirma que mais de 50% das mulheres idosas em países desenvolvidos são afetadas por essa doença.

Segundo DEVOGELAER e DEUXCHAISNES (1993), 50% dos indivíduos acometidos por fraturas osteoporóticas tornam-se totalmente dependentes de outras pessoas ou de meios auxiliares, tais como muletas ou bengalas para auxiliá-los em suas atividades de vida diária. Em média, 15% desses pacientes irão a óbito no 1º ano após a fratura e de 20% a 25% necessitarão ser institucionalizados (RIGGS e MELTON, 1992; KANIS, 1993; JOHNELL, 1996). De acordo com KANNUS et al. (1999) há uma redução em torno de 12% a 20% da expectativa de vida. A morte geralmente ocorre em conseqüência de complicações indiretas das fraturas, tais como trombose venosa profunda, embolia pulmonar e pneumonia.

Os custos relacionados à osteoporose variam amplamente entre os diferentes países, devido às diferentes incidências da doença e devido à ênfase dada à prevenção, hospitalização e tratamento (SARTORI e MAGGI, 1995). Nos Estados Unidos, as fraturas de colo do fêmur resultam em 300 mil hospitalizações, com gastos estimados de 10 bilhões de dólares por ano (YOUM, KOVAL e ZUCKERMAN, 1999). No Brasil, há escassez de dados referente à população acometida pela osteoporose.

1.1. Osteoporose

A perda fisiológica de massa óssea ocorrida com a idade é denominada de osteopenia. Segundo NGUYEN et al. (1994), osteopenia se refere à condição na qual a quantidade de osso por unidade de área é mais baixa que a esperada para indivíduos da mesma idade e mesmo sexo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a osteoporose como “doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura” (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993).

Segundo RIGGS e MELTON (1992), osteoporose é uma redução da massa óssea suficiente para produzir manifestações clínicas. A osteoporose é a alteração metabólica mais freqüente acometendo ossos, caracterizando-se pela diminuição lenta e progressiva da massa óssea (WILLS, 1998), comprometendo a integridade do arcabouço ósseo, diminuindo sua resistência e propiciando fraturas dos ossos acometidos, mesmo nos mínimos esforços (BRAVO et al., 1996; PLAPLER, 1997).

A osteoporose inicialmente é assintomática. Alguns autores, como SAVILLE (1941), citado por DANOWSKI (1996) a define como “epidemia silenciosa do século XX” ou “doença traiçoeira”. As primeiras manifestações clínicas surgem quando já houve perda de 30% a 40% de massa óssea, sendo as fraturas as principais conseqüências clínicas da osteoporose.

A osteoporose sintomática é encontrada em três grupos etários mal definidos e superpostos. Segundo MELTON e RIGGS (1986), a osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A osteoporose primária, a mais freqüente, pode ser dividida em tipo I e tipo II. Na osteoporose tipo I (osteoporose pós-menopausa) há uma alta reabsorção óssea, decorrente de atividade osteoclástica acelerada, e na osteoporose tipo II (osteoporose senil ou de involução) há uma reabsorção óssea normal ou ligeiramente aumentada, associada à atividade osteoblástica diminuída.

A osteoporose secundária está associada a uma grande variedade de condições mórbidas primárias que podem resultar em distúrbios da absorção intestinal de cálcio ou em hipoestrogenismo precoce, como:

- Enfermidades endócrinas (tireoideopatias, hipogonadismo, síndrome de Cushing, diabetes mellitus, hiperparatireoidismo);
- Câncer (metástases, mieloma múltiplo);
- Doenças inflamatórias crônicas intestinais, gastrectomia, anastomose jejuno-ileal;
- Ingestão de fármacos (heparina, corticosteróides, retinóides, extratos tireoideanos, lítio, metotrexato, fenitoína, hidantoína e gardenal);
- Doenças renais crônicas;
- Baixa ingestão de cálcio

No entanto, RIGGS (1999), citado em MARQUES NETO (2001), sugeriu a substituição da sinonímia osteoporose tipo I e tipo II por um conceito unitário de osteoporose primária. Essa orientação se justifica porque fica cada vez mais improvável de que as funções dos osteoblastos e dos osteoclastos sejam tão passíveis de esquematização que possam compor duas doenças diferentes. É mais fácil considerar que os pacientes em determinadas fases da vida apresentam maior atividade osteoclástica ou menor atividade osteoblástica.

1.1.1. Fisiopatogenia

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células (osteócito, osteoblasto e osteoclasto) e material intercelular calcificado (matriz óssea) (PARFITT e CHIR, 1987).

Os osteócitos são células existentes no interior da matriz óssea, ocupando lacunas das quais partem canalículos. No interior dos canalículos, os prolongamentos de osteócitos vizinhos estabelecem contato através de junções especiais, que permitem o fluxo intercelular de íons e outras moléculas que controlem o crescimento e desenvolvimento ósseo (PARFITT e CHIR, 1987; VÄÄNÄNEN, 1991; TEITELBAUM, TONDRAVI e ROSS, 1996). Os osteoblastos são células de origem mesenquimal e responsáveis pela síntese e secreção da matriz protéica, são caracterizados pela sua localização e morfologia, com receptores para o hormônio paratireóideo (PTH), para a 1,25 dihidroxivitamina D e apto a sintetizar proteínas que constitui a matriz orgânica como o colágeno I, osteocalcina e osteopontina. E os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de células hematopoiéticas da série de monócitos fagócitos (VÄÄNÄNEN, 1991; KANIS, 1998).

O osso é um tecido vivo que se renova permanentemente durante toda a vida. Essa renovação deve-se às células ósseas responsáveis pela atividade de formação (osteoblastos) e de reabsorção (osteoclastos) do tecido ósseo. Esse sistema de “construção e destruição” é denominado remodelação óssea (MUNDY, 1999). A remodelação óssea se inicia por meio de um sinal químico para os osteoblastos em repouso. Gera-se a partir daí, sinais parácrinos para os osteoclastos próximos e para os precursores de osteoclastos, que reabsorvem uma área do osso mineralizado. Em seguida, há recrutamento de osteoblastos para o mesmo local, os quais preenchem a cavidade de reabsorção recém criada (KANIS, 1998; MANOLAGAS, 2000).

No indivíduo hígido, a formação supera a reabsorção até cerca de 25 a 30 anos, quando é atingido o pico de massa óssea. Entre 35 e 40 anos, a reabsorção e a formação são equilibradas, sem ganho ou perda real. Após os 40 anos de idade, a reabsorção supera a formação e tanto mulheres quanto homens perdem cerca de 0,3 a 0,5% da massa óssea por ano (KANIS, 1998).

Em geral, há um excelente equilíbrio entre a reabsorção óssea por osteoclastos e subsequente restauração do osso por osteoblastos. Há evidências que na osteoporose, a perda do osso é resultado de um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea (MANOLAGAS, 2000). Inúmeros fatores sistêmicos e locais atuam sobre esse sistema, tais como aspectos nutricionais (RAISZ, 1999), fatores raciais e genéticos (EISMAN, 1999; AKHTER et al., 2000), atividade física (PLAPLER, 1997; MALMROS et al., 1998; MITCHELL, GRANT e AITCHISON, 1998) e influência hormonal.

Dentre as alterações hormonais mais conhecidas relacionadas ao processo de remodelamento ósseo destaca-se a ação de hormônios que agem sobre a formação óssea, como a calcitonina que age como um antagonista fisiológico do PTH em relação ao cálcio e o hormônio do crescimento principalmente nos primeiros anos de vida (SØGAARD et al., 1997). Outros hormônios têm atuação sobre a estimulação da reabsorção óssea, como o PTH (EINHORN, 1996; SØGAARD et al., 1997), concentrações baixas de vitamina D3 (FELDMAN, MALLOY e GROSS, 1996; KASSTAD et al., 2001) e o declínio dos níveis de estrógeno, que leva à perda óssea rápida, constituindo a principal causa de osteoporose pós-menopausa (LINDSAY, 1996).

O estrogênio exerce atividade anti-reabsortiva, por meio de vários mecanismos de ação ainda não suficientemente esclarecidos. Um deles, faz-se por ação direta, por meio da ligação com seu receptor no osteoblasto aumentando a formação óssea. Outras evidências sugerem que o estrogênio possa atuar na síntese e/ou secreção de calcitonina, que é potente inibidor da reabsorção óssea (VÄÄNÄNEN e HÄRKÖNEN, 1996; KANIS, 1998).

1.1.2. Diagnóstico e tratamento

Atualmente o método mais indicado para o diagnóstico da osteoporose e, em mulheres, para a avaliação preventiva da diminuição da massa óssea que segue a menopausa é a densitometria duo-energética (*dual energy X-ray absorptiometry-DEXA*) (PICARD et al., 2000). Os resultados indicam ser esta técnica de grande aplicabilidade clínica, uma vez que apresenta alta precisão (0,5 a 2%) e sensibilidade, menor dose de radiação (1 a 3 REM), rapidez para a realização do exame (3 a 7 minutos) e melhor resolução de imagens (WILLS, 1998). Uma outra técnica bastante recente de quantificação da massa óssea é a ultra sonometria óssea, que é indicada para avaliação do risco de fratura (GIAVARESI et al., 2000).

Uma vez instalada a osteoporose, os tratamentos resultam geralmente em uma redução da perda de massa óssea com pouco ganho real. O tratamento de base para a manutenção da massa óssea envolve medicamentos inibidores da reabsorção óssea (calcitonina, bifosfanatos e estrógenos), estimuladores da formação óssea (vitamina D e fluoreto de sódio) e substâncias adjuvantes (cálcio e diuréticos tiazídios) (BRANDI, 1993; WIMALAWANSA, 2000). Essas diversas alternativas podem ser prescritas isoladamente ou concomitantemente para potencializar o tratamento.

De acordo com WIMALAWANSA (2000), é de extrema importância a terapia de reposição hormonal (estrogênio e/ou progesterona) em mulheres pós-menopausadas, tanto para a manutenção de massa óssea quanto para a prevenção de doenças cardiovasculares. No entanto, estudos mais recentes discutem a utilização da terapia de reposição hormonal para o tratamento da osteoporose. Segundo ARMITAGE, NOONEY e EVANS (2003), apesar da eficácia para a preservação da massa óssea e da redução subsequente do risco de fratura ser bem estabelecido, a terapia de reposição

hormonal é associada a um aumento do risco de câncer de mama e de ovário e de doenças tromboembólicas, com aumento evidente do risco de acidente vascular encefálico.

A atividade física desempenha um papel importante no tratamento e prevenção da osteoporose e a inatividade física, ao contrário, é um fator que colabora intensamente para a rarefação óssea (MALMROS et al., 1998; MITCHELL, GRANT, e AITCHISON, 1998). No entanto, segundo GOLD (1996), o exercício isoladamente não previne a perda óssea que ocorre após a menopausa, de maneira que deve ser usado como tratamento coadjuvante para a osteoporose.

1.1.3. Perspectivas futuras do tratamento da osteoporose

A osteoporose é um problema de saúde pública de grande impacto social e econômico para o qual ainda não foi determinado um tratamento de aceitação universal. Avanços recentes têm sido realizados por pesquisadores acadêmicos e pela indústria farmacêutica na procura de terapêuticas melhores e mais eficazes que as atualmente disponíveis para a prevenção e/ou tratamento da osteoporose.

Para acompanhar e determinar possíveis fatores causadores da osteoporose, suas conseqüências e tratamento, geralmente são utilizados ratos. A ovariectomia (OVX) em ratas constitui um modelo de osteopenia experimental, pois imita a perda óssea trabecular pós-menopausal (HODGKINSON, 1979; PENG et al., 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995). De acordo com VANDERSCHUEREN et al. (1992), TUUKKANEN, PENG e VÄÄNÄNEN (1994), é possível verificar significativa perda de massa óssea 8 semanas após a ovariectomia.

Os princípios mecânicos biológicos responsáveis pelo ganho e perda óssea durante o crescimento normal e vida adulta, e também na osteoporose, são os mesmos em humanos e ratos. Além disso, ratos e humanos respondem similarmente às influências biomecânicas (capacidade para resistir forças externas e susceptibilidade à fraturas), hormonais, de drogas e de outros fatores, sendo conveniente para a avaliação do potencial do agente terapêutico para a prevenção e/ou tratamento da osteoporose (PENG et al., 1994; MILLER, BOWMAN e JEE, 1995; THOMPSON, 1995; WIMALAWANSA, 2000).

Encontra-se atualmente em estudo a ação de diversas drogas e hormônios, entre eles a prolactina, sobre o mecanismo fisiopatológico, prevenção e tratamento da osteoporose.

1.2. Prolactina

A prolactina (PRL) é um hormônio protéico sintetizado, armazenado e secretado pelos lactotrófos, células especializadas da adeno-hipófise. É composta por uma cadeia polipeptídica única, com 198 aminoácidos, três pontes dissulfetos e peso molecular de aproximadamente 23.000 dáltons (YEN e JAFFE, 1991; DeGROOT, 1995; FREEMAN et al., 2000; AMAR e WEISS, 2003). Seu gene (localizado no cromossomo 6) e estrutura são homólogos ao do hormônio do crescimento (AMAR e WEISS, 2003).

1.2.1. Controle da secreção de prolactina

A PRL é um hormônio hipofisário cuja secreção é mantida sob o controle inibitório hipotalâmico, mediado pela liberação de dopamina (DA). A DA é o principal fator de inibição da prolactina (PIF - *prolactin inhibiting factor*) e é secretada na circulação porta-hipofisária pelo sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA), cujos corpos celulares estão localizados no núcleo arqueado. A DA atinge os lactotrófos e acopla-se a receptores específicos presentes na membrana (FREEMAN et al., 2000). Um segundo fator hipotalâmico inibidor da liberação da PRL é a somatostatina, que inibe a secreção do hormônio de crescimento e o hormônio tireo-estimulante (TSH).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) também promove inibição da secreção de PRL. O GABA é secretado no sistema porta-hipofisário, atingindo receptores presentes nos lactotrófos. Sua concentração na circulação porta-hipofisária é inversamente proporcional à secreção de PRL. Entretanto, sua capacidade de inibir a secreção de PRL é muito menor do que a DA. Tem sido proposto que, diferentemente da DA, o GABA tem sua ação inibitória presente em resposta a certos estímulos, não sendo constantemente secretado no sistema porta hipofisário (YEN e JAFFE, 1991). DUVILANSKI et al. (1995) verificaram que o óxido nítrico (NO) também pode exercer um controle inibitório sobre a secreção de PRL.

Apesar do controle da secreção hipotalâmica de PRL ser dominado basicamente pelos fatores de inibição (principalmente a DA), a ação de fatores de liberação parece ser necessária. Isso é evidenciado em certas condições em que se observa aumento da secreção de PRL sem que ocorra diminuição da concentração de DA no sistema porta-hipofisário (FREEMAN et al., 2000).

O hormônio de liberação de tireotrofina (TRH) e numerosos candidatos a fatores de liberação da PRL (PRF - *prolactin releasing factor*) (peptídeo intestinal-vasoativo, peptídeo histidina-isoleucina, oxitocina, angiotensina-2, neurotensina, galanina e neurofina-2) estimulam a liberação de PRL, mas seus mecanismos de ação e função são incertos (LAMBERTS e MacLEOD, 1990). O gene de um peptídeo liberador de PRL (PrRP) foi clonado por HINUMA et al., em 1998. IBATA et al. (2000), verificaram que o PrRP parece liberar PRL da hipófise anterior *in vitro*.

O estrógeno aumenta tanto a síntese como a secreção de PRL pela hipófise. O mecanismo de ação envolve ligação a receptor no lactotrófo, com ativação de transcrição gênica e acúmulo de mRNA, efeito anti-dopaminérgico, diminuindo a capacidade da DA em inibir a síntese e secreção de PRL (CARÓN, SALICIONI e DEIS, 1997). Outras condições associadas ao aumento da liberação de PRL são exercício físico extenuante, estresse físico e emocional, ato sexual, estimulação do mamilo em mulheres não-grávidas, entre as fases folicular e lútea do ciclo menstrual, gestação e a lactação (VILLANUEVA e LARA, 1998).

Existem ainda evidências de que a própria PRL regule a sua secreção, agindo diretamente no hipotálamo, estimulando a secreção de DA (mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta). Estudos evidenciam que o endotélio é um regulador autócrino da secreção de PRL, porém o mecanismo fisiológico ainda não está totalmente esclarecido (KANYICKSKA, LERANT e FREEMAN, 1998).

É possível que o cálcio (Ca^{+2}) seja o 2º mensageiro direto regulando a secreção de PRL pelos lactotrófos, dependente de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) ou vias mediadas por PKC (proteína Kinase C) servindo para modular as vias Ca^{+2} dependentes (LAMBERTS e MacLEOD, 1990; KUZMINA et al., 1999).

O mecanismo de regulação da PRL ainda não está esclarecido por completo. A PRL é secretada de forma pulsátil, com pico máximo durante o sono noturno. A liberação de PRL em humanos começa a aumentar gradativamente após o início do sono

(10 a 60 minutos) e envolve uma série de picos de secreção (3 a 8 durante a noite). Na primeira hora após o despertar, a concentração de PRL reduz rapidamente, atingindo sua concentração mínima no final da manhã entre 9 e 11 horas (FREEMAN et al., 2000).

Como descrito anteriormente, múltiplos fatores controlam a secreção de PRL pela hipófise. A interação desses efeitos ocorrendo na hipófise ou no hipotálamo (particularmente na eminência média), determina o perfil fisiológico da secreção de PRL (MOGG e SAMSON, 1989; AMAR e WEISS, 2003).

As concentrações plasmáticas de PRL podem variar em um mesmo indivíduo, os limites de normalidade é de 5 a 20 ng/ml na mulher e 3 a 20 ng/ml no homem. A hipersecreção de PRL (hiperprolactinemia) pode ocorrer em casos patológicos, como consequência de algumas lesões no sistema nervoso central (neoplasias cerebrais ou metastáticas, cirurgias, traumas, encefalites) e doenças hipofisárias (microprolactinomas e macroprolactinomas, acromegalia e doença de Cushing) podem elevar os níveis séricos de PRL por interrupção da conexão entre o hipotálamo e o lactotrófo (YAZIGI, QUINTERO e SALAMEH, 1997). As consequências da hiperprolactinemia em humanos incluem efeitos sobre a fertilidade, disfunção sexual, densidade óssea, doenças cardiovasculares e pode levar à esquizofrenia (MEANEY e O'KEANE, 2002).

O tratamento farmacológico é realizado com medicamentos que agem como agonistas dopaminérgicos diminuindo e normalizando a secreção de PRL nas células hipofisárias especializadas (De ROSA et al., 1998; WYNICK et al., 1998). A bromocriptina (*2-bromo- α -ergocriptina*) é um agonista dopaminérgico derivado do ácido lisérgico, que atua sobre receptores dopaminérgicos da adeno-hipófise, agindo diretamente sobre a inibição da secreção hipofisária de PRL (VALENTE et al., 1997; YAZIGI, QUINTERO e SALAMEH, 1997).

O rato pode ser usado como um modelo experimental para estudar *in vivo* os efeitos da hiperprolactinemia e da hipoprolactinemia sobre uma variedade de processos metabólicos. Foram desenvolvidos modelos para promover a hiperprolactinemia em ratos, entre eles, implante de células tumorais hipofisárias (ADLER et al., 1991), implante de hipófise na cápsula renal (ADLER e SOKOL, 1983), agentes farmacológicos (por exemplo, domperidone) e administração exógena de PRL (ARBOGAST e VOOGT, 1991). Em contrapartida, para o desenvolvimento da

hipoprolactinemia são utilizados agentes farmacológicos, como a bromocriptina (BCT) e a hipofisectomia (ARBOGAST e VOOGT, 1991).

1.2.2. Ações biológicas da prolactina

A PRL desempenha uma grande diversidade de ações biológicas em muitas espécies de vertebrados (DOPPLER, 1994). Além dos bem conhecidos efeitos sobre a reprodução, lactação e comportamento maternal, a PRL influencia a esteroidogênese, metabolismo, regulação imunológica (HU, ZHUANG e DUFAU, 1998) e ainda exerce efeito sobre o tecido ósseo.

1.2.2.1. Reprodução

A PRL é mais conhecida por seus múltiplos efeitos relacionados à glândula mamária, e exerce também um efeito regulatório significativo sobre a função gonadal. Em alguns mamíferos, particularmente roedores, a PRL exerce um papel importante sobre a manutenção e atividade secretora do corpo lúteo, no ovário (DUAN, LINZER e GIBORI, 1996).

A variedade dos efeitos da PRL sobre a glândula mamária incluem mamogênese, lactogênese e galactopoiese (BERN e NICOLL, 1968; AMAR e WEISS, 2003). Participa, ainda, da estimulação do desenvolvimento original do tecido mamário e de sua hiperplasia durante a gravidez. Principal hormônio responsável pela lactogênese, a PRL é necessária para induzir a síntese de enzimas relacionadas com a síntese de lactose e caseína e a lactação propriamente dita (TUCKER, 1994).

A PRL exerce efeitos tanto estimulantes quanto inibitórios sobre a reprodução, dependendo, em parte, da fase do processo reprodutor durante a qual atua (VILLANUEVA e LARA, 1998). O excesso de PRL suprime a síntese e a liberação de hormônio liberador das gonadotropinas (GnRH); há ainda evidências de que a PRL exerça um efeito inibitório sobre a expressão dos receptores de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) nas gônadas, levando, quando em excesso, a uma diminuição da sensibilidade desses tecidos às gonadotropinas, sendo causa freqüente de esterilidade feminina. Pode-se ainda, por meio deste mesmo argumento justificar a ocorrência de ciclos anovulatórios em mulheres em fase de amamentação

(GUNIN, 1996). O excesso de PRL também promove uma ação inibitória direta sobre os ovários, com diminuição da secreção de progesterona e estradiol (YEN e JAFFE, 1991).

Foram descritos efeitos comportamentais reprodutivos da PRL, como inibição da libido na espécie humana e a estimulação do comportamento protetor em animais dos genitores em relação aos recém-nascidos. NASELLO et al. (1997), verificaram diminuição do comportamento sexual em ratos na presença de níveis elevados de PRL. BRIDGES e RONSHEIM (1990), administraram BCT em ratas OVX, e verificaram que com a redução dos níveis plasmáticos de PRL, houve um bloqueio do comportamento maternal.

1.2.2.2. Homeostase

Além da ação sobre os processos reprodutivos, a PRL exerce um papel sobre a manutenção da constância do ambiente interno, pela regulação do sistema imune, balanço osmótico e angiogênese.

Na literatura é descrita uma ação imunomoduladora deste hormônio, já que, nos estados de hipoprolactinemia, ocorrem menor proliferação de linfócitos e uma resposta imunitária deficiente. É conhecida uma interação bi-direcional entre a PRL e o sistema imunológico: a PRL estimula a proliferação linfocitária, estimulando deste modo a resposta imune em resposta ao antígeno, concomitantemente a PRL é localmente secretada por células imunes para controlar citocinas pró-inflamatórias. Essa influência recíproca sugere a existência de receptores específicos de PRL em algumas células imunes, como os linfócitos (FERIOLI, PIRONA e PINOTTI, 2000; MONTERO, GIOVANNONI e SEN, 2000), e ainda sugere que a PRL pode agir como um fator autócrino e/ou parácrino para modular as atividades das células do sistema imune (WEIGENT, 1996; YU-LEE, 1997).

Evidências da síntese renal de PRL e a presença de receptores de PRL no rim humano sugerem um efeito local sobre o balanço hidroeletrólítico (KAUFMAN e MACKAY, 1983). Estudos nessa área sugerem que a PRL estimula o transporte de íons através da membrana celular, e poderia ser considerado um hormônio osmo-regulatório (BERN, 1975).

A angiogênese é inibida por fragmentos proteolíticos de PRL ativa (CLAPP e DE LA ESCALERA, 1997), no entanto pesquisas mais recentes relatam que a PRL humana exerce uma atividade angiogênica (STRUMAN et al., 1999).

1.2.2.3. Tecido Ósseo

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos da PRL sobre o transporte de minerais (HORROBIN et al., 1971), e mais recentemente sobre o metabolismo do cálcio (LOTINUN, LIMLOMWONGSE e KRISHNAMRA, 1998; COSS, et al., 2000; PIYABHAN, KRISHNAMRA e LIMLOMWONGSE, 2000) e sobre o tecido ósseo.

Pouco é conhecido sobre o mecanismo de ação da PRL sobre as células ósseas e sobre o metabolismo ósseo. A PRL parece exercer um efeito sobre o osso agindo direta ou indiretamente. Como a hiperprolactinemia em adulto freqüentemente resulta em hipogonadismo, pois bloqueia a secreção de GnRH, muitos autores concluem que o efeito ósseo da PRL seja por vias indiretas e tem sido evocado para explicar a associação da PRL com a osteoporose ou decréscimo do conteúdo mineral ósseo (BILLER et al., 1992; SCHLECHTE, WALKNER e KATHOL, 1992; FUJIMAKI et al., 1994; SCHLECHTE, 1995; ADLER et al., 1998).

Porém mais recentemente, tem sido relatada uma possível ação direta da PRL nas células ósseas. Essa hipótese tem sido confirmada por estudos, como os de BOLE-FEYSOT et al. (1998) e CLEMENT-LACROIX et al. (1999) que verificaram a presença de receptores para PRL nos osteoblastos, mas não nos osteoclastos, sugerindo que a PRL possa ser requerida na formação óssea normal e na manutenção da massa óssea.

CLEMENT-LACROIX et al. (1999) verificaram por análise histomorfométrica que a ausência de receptores de PRL leva a uma diminuição da formação óssea, reduzindo a densidade mineral óssea. COSS et al. (2000) reportam um efeito direto da PRL sobre a função osteoblástica; esses autores verificaram que níveis altos de PRL podem estar correlacionado com uma redução da formação óssea *in vivo*.

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos da prolactina sobre a massa óssea de ratas ovariectomizadas, por meio da análise de parâmetros físicos, biométricos, biomecânicos e bioquímicos do fêmur, bioquímicos séricos e da análise da densitometria óssea da tíbia.

2.1. Objetivos específicos

Observar a eficácia do procedimento metodológico utilizado para promover osteopenia em ratas;

Observar a eficácia do procedimento metodológico utilizado para promover a hiperprolactinemia em ratas;

Observar a eficácia do procedimento metodológico utilizado para promover a hipoprolactinemia em ratas;

Observar o crescimento ponderal das ratas dos grupos experimentais;

Correlacionar os níveis de prolactina com os demais parâmetros ósseos analisados.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Protocolo Experimental

Para o estudo foram utilizadas ratas Wistar, com quatro meses de idade e peso corporal médio de 250 gramas no início do experimento, provenientes do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram alimentados com ração comercial e água à vontade, mantidos em regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlada à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Com exceção dos grupos basal e intacta, todos os animais sofreram ovariectomia, com o objetivo de induzir osteopenia, realizada conforme técnica descrita por ZARROW, YOCHIM e McCARTHY (1964).

Para a realização do experimento as ratas foram divididas nos seguintes grupos:

Grupo 1: Basal

- ratas intactas sem tratamento, sacrificadas no início do experimento, com 4 meses de idade - (**basal**) (n=12)

Segundo KALU (1991), o crescimento ósseo em ratos sexualmente maduros se torna mais lento, mas não cessa, por isso o uso desse modelo exige a inclusão de um grupo de animais sacrificados no início do estudo para servir de controle basal.

Grupo 2: Hiperprolactinemia (HiperPRL)

- Controle 1: ratas intactas com 6 meses - (**inta 6m**) (n=9)
- Controle 2: ovariectomia + cirurgia fictícia de implante de hipófise - (**ovx + sham**) (n=11)
- Experimental: ovariectomia + implante de 2 hipófises na cápsula renal - (**ovx + hip**) (n=13)

A hiperprolactinemia foi induzida pelo implante de duas glândulas hipófise sob a cápsula do rim esquerdo, removidas de duas ratas doadoras da mesma idade, (CHEN et al., 1970; AGUADO, GINENEZ e RODRIGUES, 1977; AGUADO, ALVIAL e RODRIGUEZ, 1981; DRAGO e CONTINELLA, 1985). A distância do hipotálamo e a glândula implantada sob a cápsula renal remove tanto a regulação inibitória como a regulação estimulatória do hipotálamo (HARRIS e JACOBSON, 1952). Como a secreção de PRL é controlada predominantemente pela regulação inibitória dopaminérgica do hipotálamo, a glândula implantada continua secretando PRL para a circulação, o que pode ser confirmado pelos níveis plasmáticos de PRL (TABELA 1). Os animais do grupo ovx + sham foram sujeitos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas não receberam o implante da glândula.

Grupo 3: Hipoprolactinemia (HipoPRL)

- Controle 1: ratas intactas + salina - (**inta + sal**) (n=10)
- Controle 2: ovariectomia + salina - (**ovx + sal**) (n=8)
- Experimental: ovariectomia + bromocriptina - (**ovx + bct**) (n=9)

O tratamento se iniciou 24 horas após a ovariectomia, com injeções subcutâneas uma vez ao dia, entre 9-10 horas. A dose de bromocriptina (BCT) utilizada foi de 3 mg/kg, (ARBOGAST e VOOGT, 1991) e a dose de salina 0,9% foi de 0,1 ml/100g PC. O tratamento foi realizado durante 8 semanas (6 dias por semana).

Ao término de 8 semanas, todas as ratas foram sacrificadas por decapitação. No momento da decapitação foi realizada coleta de sangue para a dosagem de PRL e para a realização da análise bioquímica das concentrações de minerais do soro e da atividade da fosfatase alcalina. Os fêmures e tíbias, tanto direitos como esquerdos, foram retirados, dissecados e mantidos em salina a 0,9% e a -20° C.

Em seguida, foi realizada a dosagem de PRL para confirmar a eficácia do procedimento metodológico (implante de hipófise e administração de BCT).

3.2. Dosagem de prolactina

A dosagem da concentração plasmática de PRL, foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIA) de duplo anticorpo, no laboratório de Fisiologia Endócrina/USP – Ribeirão Preto, conforme técnica descrita por NISWENDER et al. (1969).

Os valores da concentração de PRL plasmática estão expressos em nanogramas por mililitros (ng/ml). A referência para os valores é dada pela NIDDK-rPRL-RP₃.

Os resultados estão demonstrados na TABELA 1.

TABELA 1. Dosagem de prolactina (Média ± EPM)

	Grupos (n)	PRL (ng/ml)
	Basal (12)	10,15 ± 3,38
HiperPRL	Inta 6m (9)	4,04 ± 1,06
	Ovx + sham (11)	2,77 ± 0,29
	Ovx + hip (13)	10,51 ± 4,92 ^{i*}
HipoPRL	Inta + sal (10)	4,69 ± 1,27
	Ovx + sal (8)	3,24 ± 0,58
	Ovx + bct (9)	1,45 ± 0,03 ^{bi*}

p ≤ 0,05. No grupo hiperPRL: ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

Sabe-se que ocorre um pico de PRL durante a fase estral da rata. No grupo basal, acredita-se que os altos níveis de PRL, se deva ao fato de que a maioria das ratas que compõem esse grupo se encontrarem nessa fase estral. Nas ratas OVX, como não ocorre ovulação, esse pico de PRL é eliminado.

3.3. Variáveis estudadas

3.3.1. Peso corporal

O peso corporal dos animais foi verificado semanalmente para o monitoramento da saúde dos animais, e no caso do grupo hipopRL para a correção do volume da bromocriptina e salina a ser administrado.

3.3.2. Ensaio mecânico de flexão a três pontos

O teste biomecânico (flexão óssea) foi realizado no fêmur direito. Doze horas antes dos ensaios, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento que antecedeu ao teste. Os ensaios biomecânicos foram realizados na máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444 (FIGURA 1), em temperatura ambiente, de acordo com metodologia utilizada por ENGESAETER, EKELAND e LANGELAND (1978) e PENG et al. (1994). Foi utilizada a célula de carga com capacidade máxima de 100 kgf.

Para a realização do ensaio, as extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3,0 mm, suportados por apoios distanciados de 21,70 mm. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterior anterior, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com o rolete de 3,0 mm fixada na sua extremidade, numa velocidade constante de 0,5 cm/min até a fratura do osso. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados por meio de um software próprio do equipamento.

Desse modo, obteve-se as curvas de força-deformação para os diversos ensaios. A partir daí foram calculados a força máxima (N), a rigidez (dF/dx) (N/mm) e a energia de absorção ou resistência (mJ) (FIGURA 2).

A força máxima é definida como a carga máxima que o osso pode suportar. A rigidez corresponde à inclinação da reta ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica, é calculada pela divisão da força pela deformação em qualquer ponto ao longo desta reta, esse parâmetro mede a capacidade do tecido ósseo em resistir a deformações. A energia de absorção é a medida da quantidade de energia necessária para causar fratura, corresponde a área sob a curva-deformação até o ponto de força máxima.

3.3.3. Comprimento e diâmetro (maior e menor) do fêmur

Previamente aos ensaios biomecânicos, os comprimentos dos fêmures direitos foram medidos com um paquímetro (precisão 0,05mm). Após o teste de flexão a três pontos, foram medidos os diâmetros externos maior e menor da porção distal da diáfise femoral com a utilização do mesmo instrumento.



FIGURA 1. Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) demonstrando um teste de flexão a três pontos em um fêmur de rato. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria.

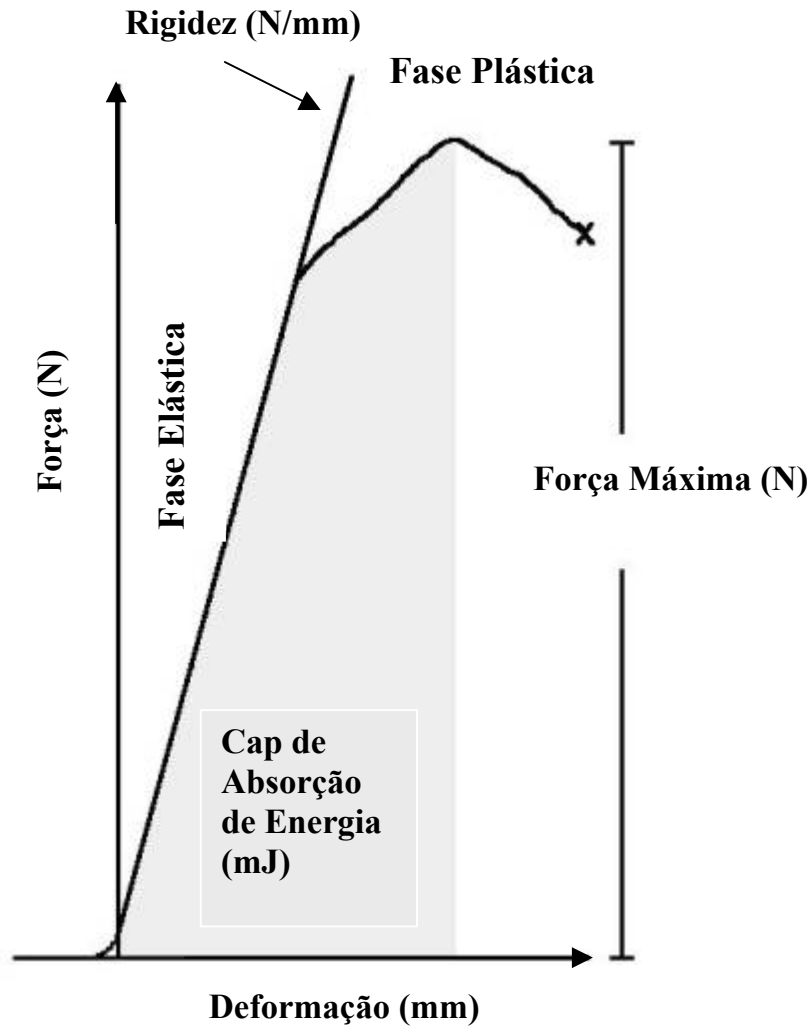


FIGURA 2. Representação do gráfico força-deformação obtido durante o teste de flexão a três pontos do fêmur de ratos. Estão representadas as definições das propriedades mecânicas analisadas neste estudo. Rigidez (inclinação da reta), força máxima e capacidade de absorver energia (área sombreada).

3.3.4. Propriedades físicas do fêmur

Após a realização do teste de flexão a três pontos, os fêmures direitos foram mantidos em água destilada e colocados no dessecador durante 24 horas com a finalidade de retirar o ar dos poros ósseos. Em seguida, foram obtidos o peso do fêmur imerso em água (P_i) e o peso úmido (P). Após esse procedimento, os ossos foram desidratados colocando-os em uma estufa (marca Funbec) a 100°C durante 24 horas, obtendo-se assim o peso seco (P_s) do fêmur direito.

No passo seguinte, os ossos foram colocados em uma mufla a 800°C durante 24 horas para a obtenção do material mineral (P_m). Para tais mensurações foi utilizada uma balança eletrônica (marca Chyo). O volume ósseo, calculado seguindo o Princípio de Arquimedes, a densidade mineral e óssea, bem como os percentuais ósseos, mineral e orgânico, foram calculados a partir das equações (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual ósseo de água} = \frac{P - P_s}{P} 100 \text{ (\%)}$$

$$\text{Percentual ósseo de material orgânico} = \frac{P_s - P_m}{P} 100 \text{ (\%)}$$

$$\text{Percentual ósseo de material mineral} = \frac{P_m}{P} 100 \text{ (\%)}$$

P_m - Peso do material mineral
 P_s - Peso ósseo da amostra desidratada
 P - Peso úmido do osso
 P_i - Peso do osso imerso em água
 ρ - Densidade da água

3.3.5. Parâmetros bioquímicos sérico e do fêmur

A análise bioquímica sérica e do fêmur foi realizada por meio de kit comercial da marca Labtest. Foram analisadas as concentrações de cálcio, fósforo e da atividade da fosfatase alcalina do soro das ratas e as concentrações de cálcio e fósforo dos fêmures direitos das ratas dos diferentes grupos experimentais. Após a obtenção do material mineral, os ossos foram solubilizados em ácido clorídrico 2N.

A leitura do fósforo e da fosfatase alcalina foi realizada por absorvância em um espectrofotômetro (espectro de 640 nm), no Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular. A leitura do cálcio foi realizada no Laboratório de Histologia e Microscopia por um leitor de micro placas.

3.3.6. Densitometria óssea da tíbia direita

O conteúdo mineral ósseo (BMC), a densidade mineral óssea (BMD) e a área das tíbias direita das ratas foram mensurados por densitometria de duplo fóton (DEXA) em um equipamento pDEXA®SABRE™ X-Ray BONE DENSITOMETER (Norland Medical System, INC., Fort Atkinson, WI, EUA), no Laboratório de Estrutura e Função Celular – ICB III – Universidade de São Paulo – São Paulo

Esse método baseia-se na análise computadorizada da atenuação de um feixe puntiforme de raios-x emitidos por uma fonte móvel constituída por fótons de duas energias distintas, 38 ou 70 KeV. Durante a realização do exame um detector movendo-se juntamente com a fonte de raios-x, faz a amostragem dos fótons que passam através de qualquer estrutura colocada entre a fonte e o detector. Um software, especialmente desenvolvido, calcula a densidade de cada amostra a partir da equação de transmissão de fótons. A utilização dos níveis de energia permite a distinção entre a densidade de tecidos mineralizados e tecidos moles, minimizando erros que resultam da irregularidade da distribuição dos tecidos moles na amostra. Os resultados apresentados são utilizados para a construção de uma imagem que permite a identificação e análise das regiões de interesse.

As grandezas medidas pelo DEXA são a área (expressa em cm^2) e o conteúdo mineral ósseo (BMC) (expresso em gramas). A partir dessas medidas, calculou-se a densidade mineral óssea (BMD) (expressa em g/cm^2). Para a obtenção dos dados desse trabalho, foram utilizados os seguintes parâmetros: área de exame ($\sim 12\text{cm} \times 4,45\text{cm}$), velocidade (10mm/s) e resolução (0,5mm x 0,5mm).

3.4. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas dos parâmetros quantitativos estudados; média (M), erro padrão da média (EPM) e número de casos (n). Na comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e, nos casos significantes, o teste de Duncan para discriminar as diferenças. Para a análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Pearson (SNEDECOR e COCHRAN, 1980). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Para todas as análises foram utilizados o programa EXCEL e o software STATISTICA.

3.5. Normas metodológicas

As referências bibliográficas, citações e a estrutura geral desse trabalho seguem a NBR 6023 – agosto/2000 e a NBR 10520 – julho/2001, de autoria da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

As abreviaturas dos títulos das revistas utilizadas nas referências bibliográficas seguem a obra Serial Sources publicada pelo BIOSIS (1991).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados a seguir em forma de tabelas e figuras. Os grupos HiperPRL e HipoPRL foram analisados separadamente, no entanto, para facilitar a visualização dos resultados os grupos estão apresentados na mesma figura. O grupo basal, apesar de ser um único grupo, aparece tanto nos gráficos do grupo HiperPRL e HipoPRL. Os resultados nas tabelas estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média) e nas figuras estão expressos em média, EPM e intervalo de confiança ($\pm 1,96 \cdot \text{EPM}$).

4.1. Propriedades Biométricas

4.1.1. Peso Corporal

A TABELA 2 apresenta os valores do peso corporal médio inicial e final e a variação do peso corporal durante o experimento dos diferentes grupos experimentais. As FIGURAS 3 e 4 apresentam respectivamente a variação e a evolução do peso corporal durante todo o procedimento experimental. Pode-se observar que a ovariectomia promoveu um maior aumento dos pesos dos animais tanto no grupo HiperPRL como no grupo HipoPRL. O implante de hipófise e o tratamento com bromocriptina não modificaram este ganho de peso corporal.

TABELA 2. Peso corporal (PC) inicial, final e variação do peso corporal dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Grupos (n)	PC inicial (g)	PC final (g)	Variação PC (g)
	Basal (12)	246,83 \pm 2,18		
HiperPRL	Inta 6m (9)	247,56 \pm 4,60	273,33 \pm 5,32	25,78 \pm 4,09
	Ovx + sham (11)	247,18 \pm 3,98	299,73 \pm 6,97	52,55 \pm 5,12 ⁱ
	Ovx + hip (13)	249,46 \pm 3,12	303,62 \pm 5,45	54,15 \pm 4,55 ⁱ
HipoPRL	Inta + sal (10)	237,60 \pm 2,76	255,50 \pm 3,90	17,88 \pm 2,21
	Ovx + sal (8)	241,70 \pm 2,55	305,00 \pm 8,00	63,30 \pm 6,14 ⁱ
	Ovx + bct (9)	250,89 \pm 3,28	318,78 \pm 4,58	67,89 \pm 6,14 ⁱ

p \leq 0,05. No grupo hiperPRL: ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ⁱ vs inta+sal.

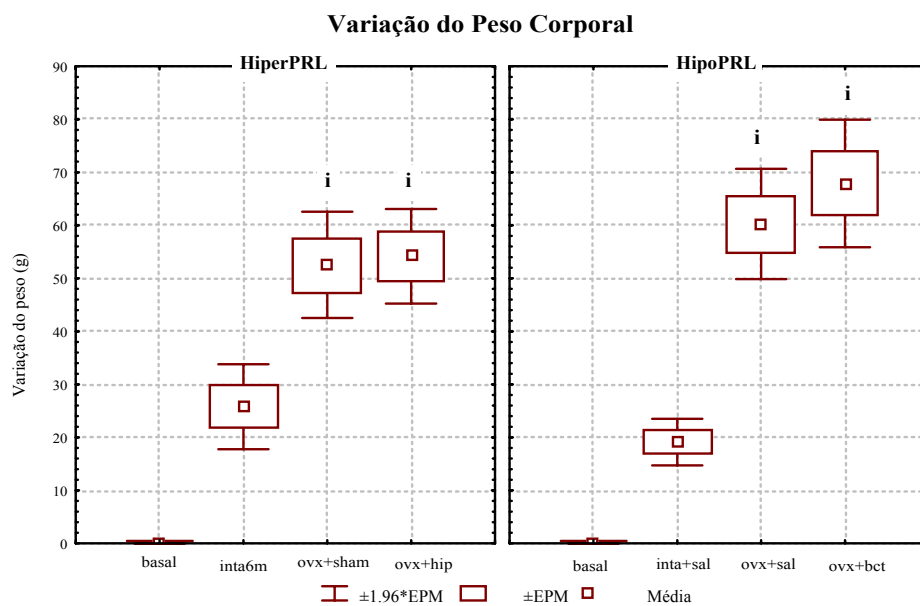
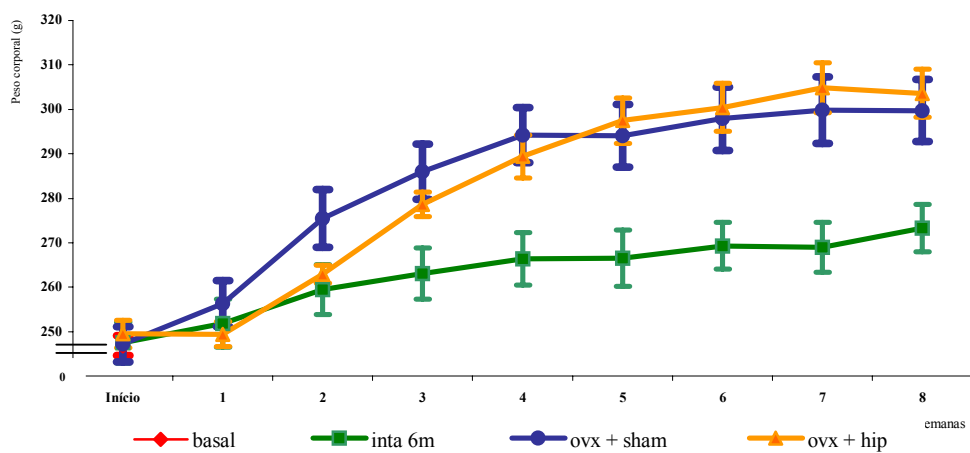


FIGURA 3. Variação do peso corporal das ratas dos diferentes grupos experimentais. $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ⁱ vs inta+sal

Evolução do peso corporal do grupo HiperPRL



Evolução do peso corporal do grupo HipoPRL

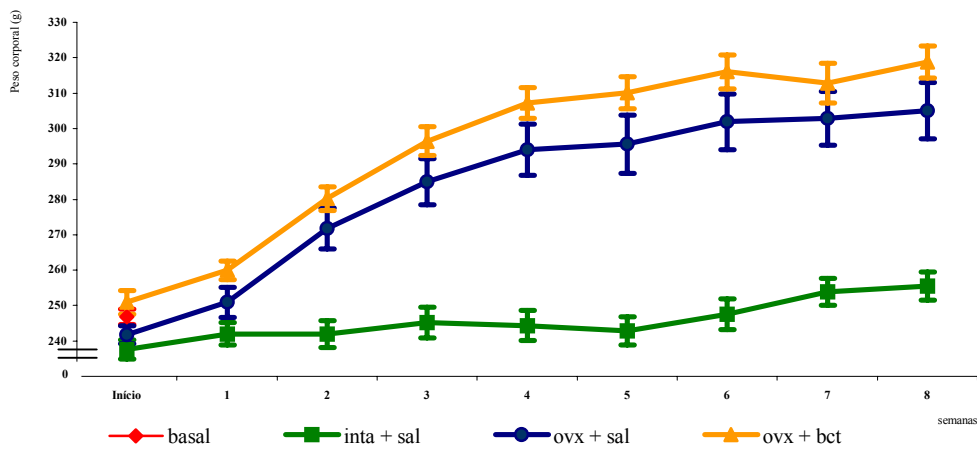


FIGURA 4. Evolução da média do peso corporal, expresso em gramas, das ratas dos diferentes grupos experimentais.

4.1.2. Comprimento e diâmetros (maior e menor) do fêmur

A TABELA 3 e as FIGURAS 5, 6 e 7 apresentam as medidas do comprimento do fêmur e do diâmetro externo maior e menor da diáfise femoral dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os grupos ovx+hip e ovx+sham apresentaram um aumento significativo dos parâmetros comprimento e diâmetro maior do fêmur quando comparados ao grupo basal. Os grupos ovx+bct e ovx+sal tiveram um aumento significativo dos parâmetros comprimento e diâmetro maior, comparado aos grupos inta+sal e basal.

TABELA 3. Parâmetros biométricos do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média ± EPM)

	Grupos (n)	Comprimento do Fêmur (mm)	Diâmetro maior (mm)	Diâmetro menor (mm)
	Basal (12)	34,48 ± 0,15	3,42 ± 0,04	2,53 ± 0,03
HiperPRL	Inta 6m (9)	36,04 ± 0,17 ^b	3,50 ± 0,06	2,62 ± 0,05
	Ovx + sham (11)	36,32 ± 0,37 ^b	3,82 ± 0,06 ^{bi}	2,56 ± 0,04
	Ovx+ hip (13)	35,89 ± 0,35 ^b	3,72 ± 0,05 ^{bi}	2,66 ± 0,04
HipoPRL	Inta + sal (8)	35,49 ± 0,27 ^b	3,41 ± 0,09	2,41 ± 0,05
	Ovx + sal (10)	36,39 ± 0,24 ^{bi}	3,66 ± 0,08 ^{bi}	2,59 ± 0,04 ⁱ
	Ovx + bct (9)	36,65 ± 0,16 ^{bi}	3,79 ± 0,04 ^{bi}	2,68 ± 0,04 ^{bi}

p ≤ 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal

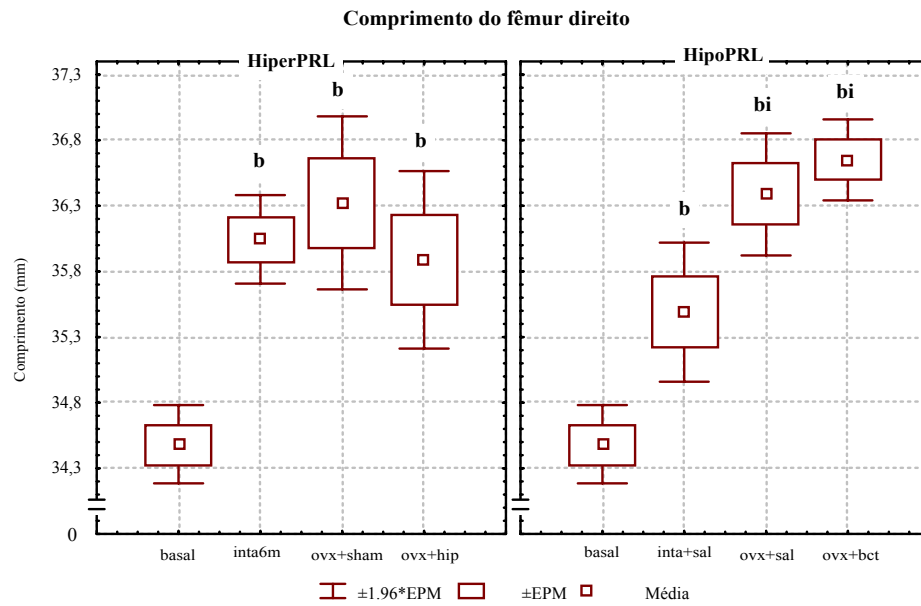


FIGURA 5. Comprimento do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal

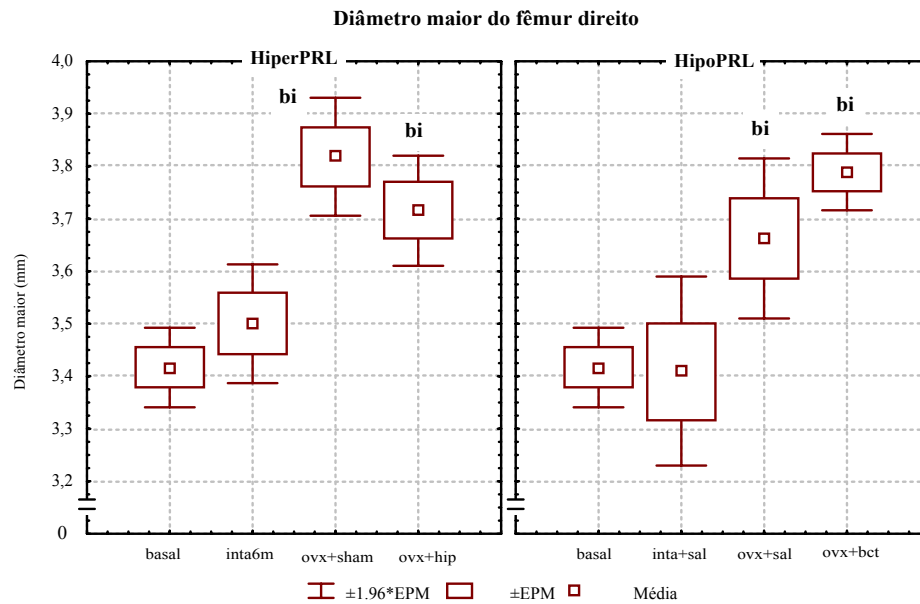


FIGURA 6. Diâmetro maior do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal

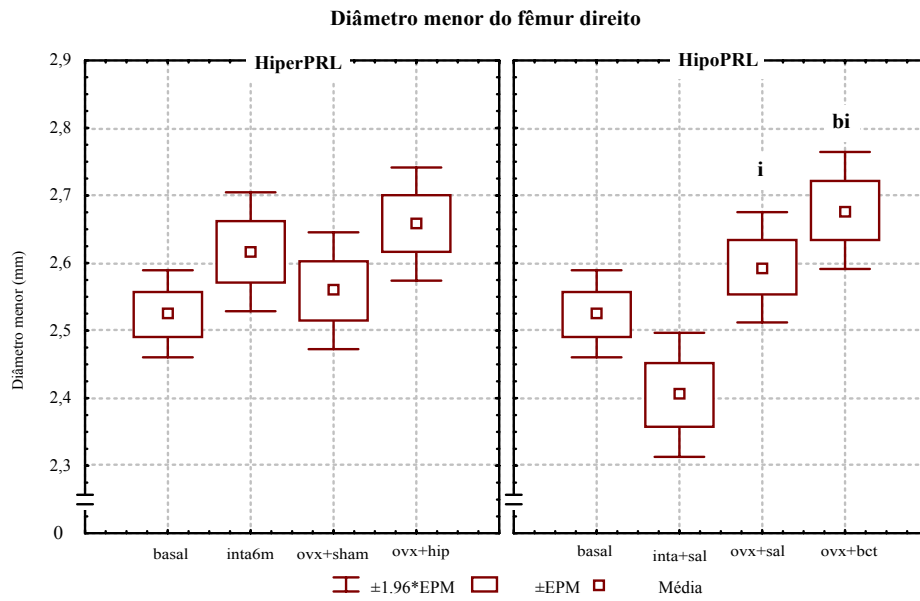


FIGURA 7. Diâmetro menor do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal

4.2. Propriedades biomecânicas do fêmur

A TABELA 4 e as FIGURAS 8, 9 e 10 apresentam os parâmetros biomecânicos obtidos com o teste de flexão a três pontos do fêmur das ratas dos diferentes grupos experimentais. Pode-se observar que a força máxima e rigidez do fêmur das ratas intactas apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo basal.

Esses dados mostram que os grupos ovx+hip e ovx+sham apresentaram uma diminuição significativa dos parâmetros força máxima e rigidez, em relação ao grupo inta6m. Pode-se observar que houve uma proteção contra a perda da força máxima e a rigidez do fêmur direito do grupo ovx+bct em relação à quando comparado aos grupos ovx+sal e basal.

TABELA 4. Parâmetros biomecânicos do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média ± EPM)

	Grupos (n)	Força Máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Absor Energia (mJ)
	Basal (12)	82,07 ± 1,78	149,71 ± 3,56	37,91 ± 1,73
HiperPRL	Inta 6m (9)	96,08 ± 2,13 ^b	179,22 ± 7,05 ^b	41,19 ± 2,62
	Ovx + sham (11)	85,56 ± 2,06 ⁱ	162,32 ± 2,72 ⁱ	36,46 ± 2,71
	Ovx + hip (13)	88,10 ± 3,04 ⁱ	160,12 ± 5,31 ⁱ	39,46 ± 3,08
HipoPRL	Inta + sal (10)	96,65 ± 2,14 ^b	179,38 ± 6,81 ^b	39,58 ± 2,39
	Ovx + sal (8)	77,65 ± 2,90 ⁱ	131,83 ± 9,74 ^{bi}	33,48 ± 2,81
	Ovx + bct (9)	97,29 ± 3,21 ^{b*}	188,89 ± 7,00 ^{b*}	39,04 ± 2,95

p ≤ 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

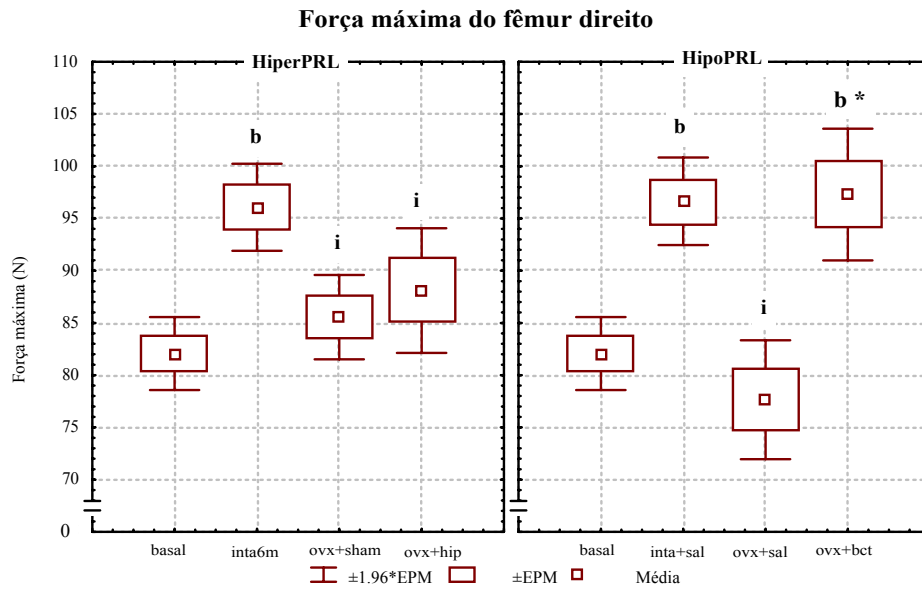


FIGURA 8. Força máxima do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.

$p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

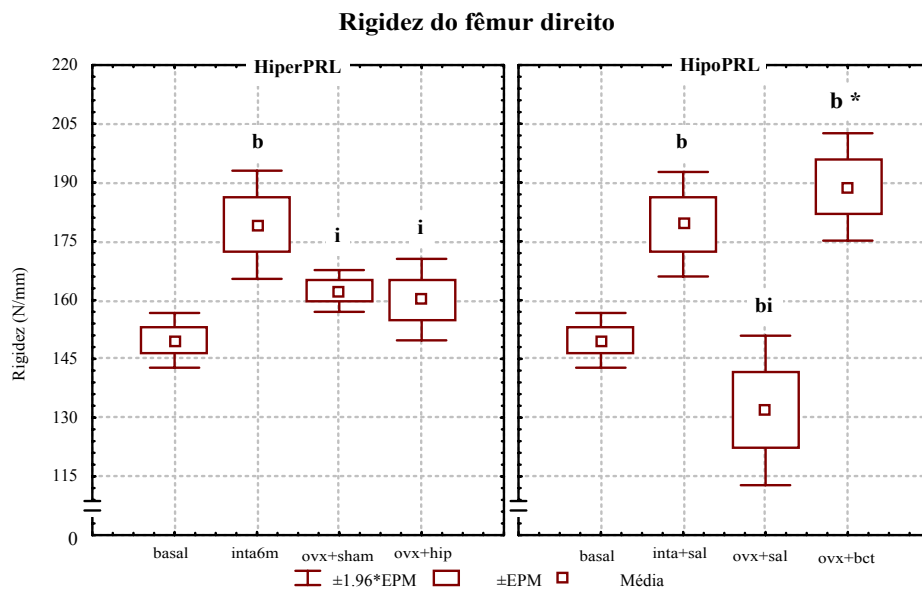


FIGURA 9. Rigidez do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.

$p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

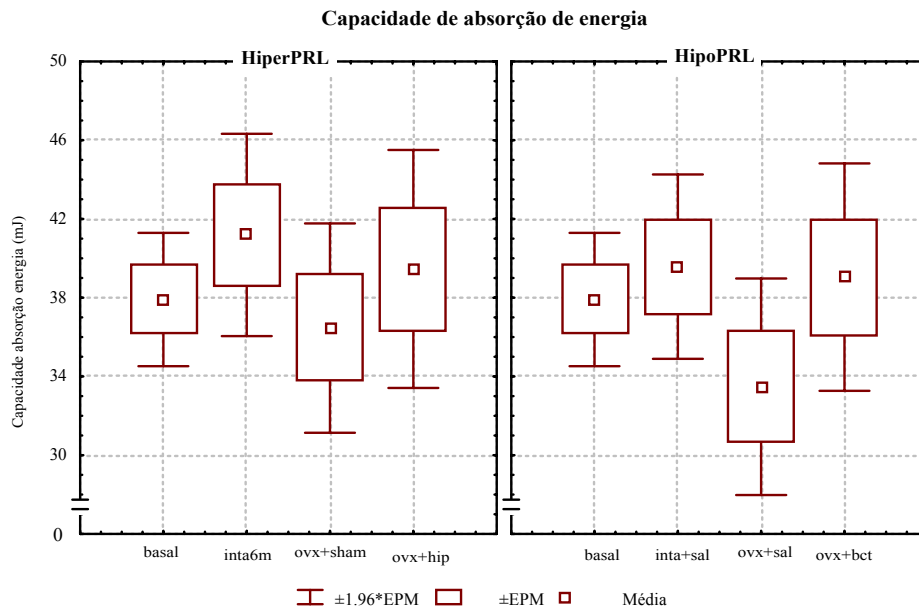


FIGURA 10. Capacidade de absorção de energia do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.

4.3. Propriedades físicas do fêmur

As TABELAS 5, 6 e 7 e as FIGURAS 11 a 20 apresentam os parâmetros físicos do fêmur direito dos animais dos diferentes grupos experimentais. A TABELA 5 e as FIGURAS 11, 12, 13 e 14 apresentam os valores do peso do fêmur imerso em água, peso seco, peso úmido e o peso das cinzas dos fêmures das ratas dos diferentes grupos.

Pode-se notar pela análise estatística realizada que os valores de todos os parâmetros nas ratas intactas (inta6m e inta + sal) foram significativamente maiores em relação ao grupo basal.

O grupo ovx+hip apresentou valores significativamente menores do peso do fêmur imerso em água, peso seco e peso cinzas em relação ao grupo inta6m. E ainda pode-se observar que houve uma redução do peso das cinzas do grupo ovx+hip, em relação ao grupo ovx+sham. Observa-se também que o grupo ovx+bct apresentou valores significativos maiores dos parâmetros peso do fêmur imerso em água, peso úmido, peso seco e peso cinzas em comparação ao grupo ovx+sal e basal.

TABELA 5. Propriedades físicas do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média ± EPM)

	Grupos (n)	Peso Imerso (g)	Peso Úmido (g)	Peso Seco (g)	Peso Cinzas (g)
	Basal (12)	0,33 ± 0,004	0,74 ± 0,01	0,44 ± 0,005	0,30 ± 0,003
HiperPRL	Inta 6m (9)	0,36 ± 0,008 ^b	0,82 ± 0,01 ^b	0,50 ± 0,008 ^b	0,35 ± 0,005 ^b
	Ovx + sham (11)	0,36 ± 0,006 ^b	0,79 ± 0,02	0,47 ± 0,006 ^{bi}	0,33 ± 0,005 ^{bi}
	Ovx +hip (13)	0,33 ± 0,009 ^{i*}	0,77 ± 0,02	0,45 ± 0,009 ⁱ	0,31 ± 0,007 ^{i*}
HipoPRL	Inta + sal (10)	0,35 ± 0,01 ^b	0,80 ± 0,02 ^b	0,48 ± 0,01 ^b	0,34 ± 0,008 ^b
	Ovx + sal (8)	0,33 ± 0,009 ⁱ	0,72 ± 0,02 ⁱ	0,43 ± 0,02 ⁱ	0,30 ± 0,01 ⁱ
	Ovx + bct (9)	0,36 ± 0,005 ^{b*}	0,82 ± 0,01 ^{b*}	0,49 ± 0,007 ^{b*}	0,34 ± 0,005 ^{b*}

p ≤ 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

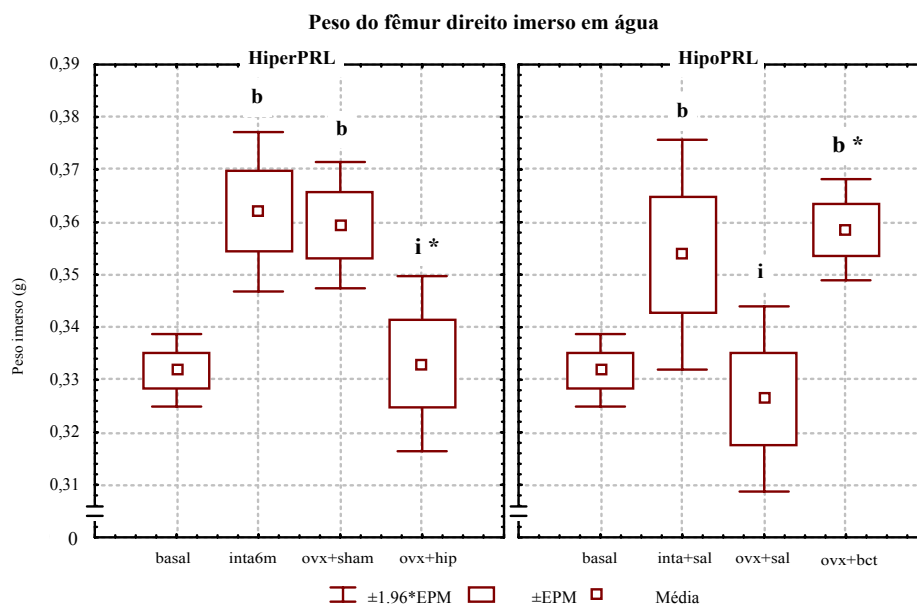


FIGURA 11. Peso do fêmur direito imerso em água das ratas dos diferentes grupos experimentais.

$p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

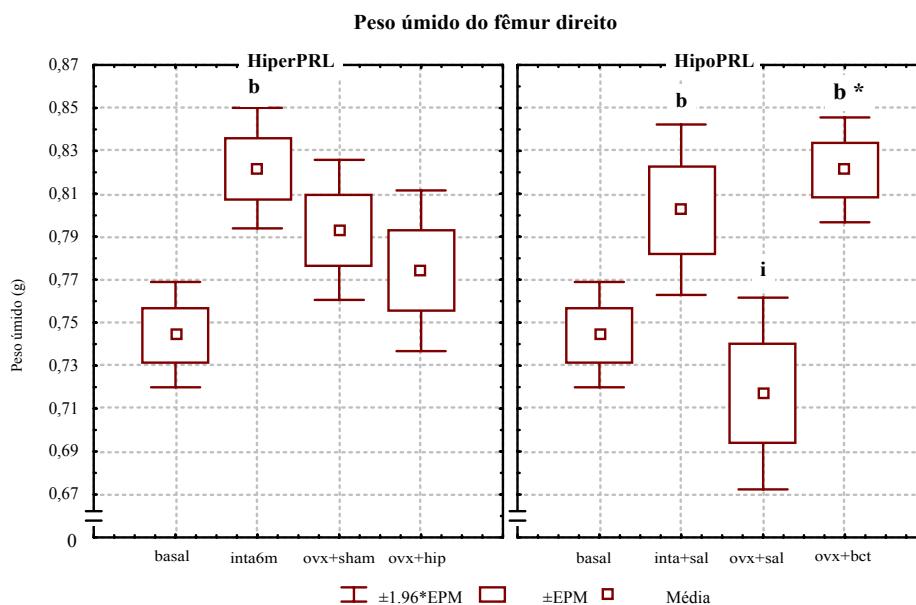


FIGURA 12. Peso úmido do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.

$p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

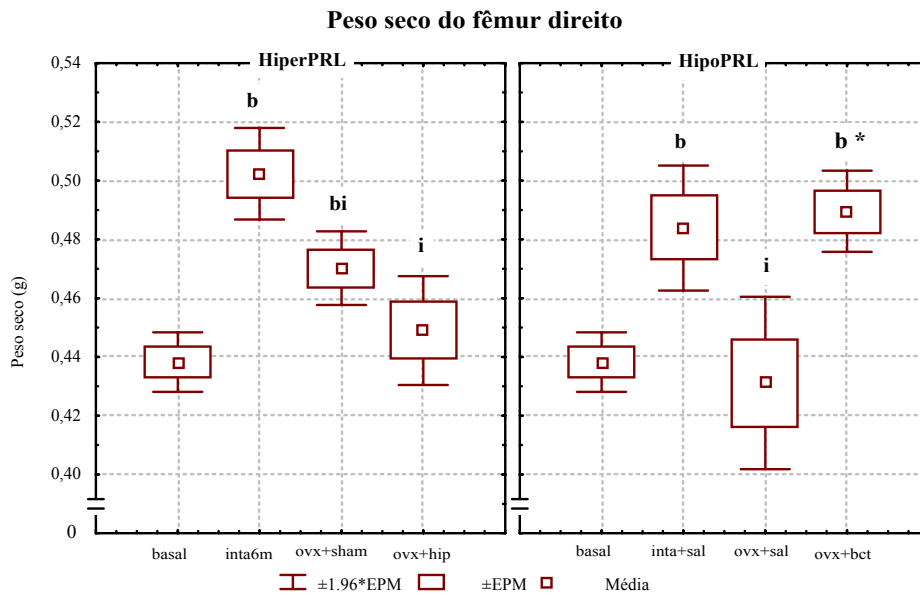


FIGURA 13. Peso seco do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais. $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

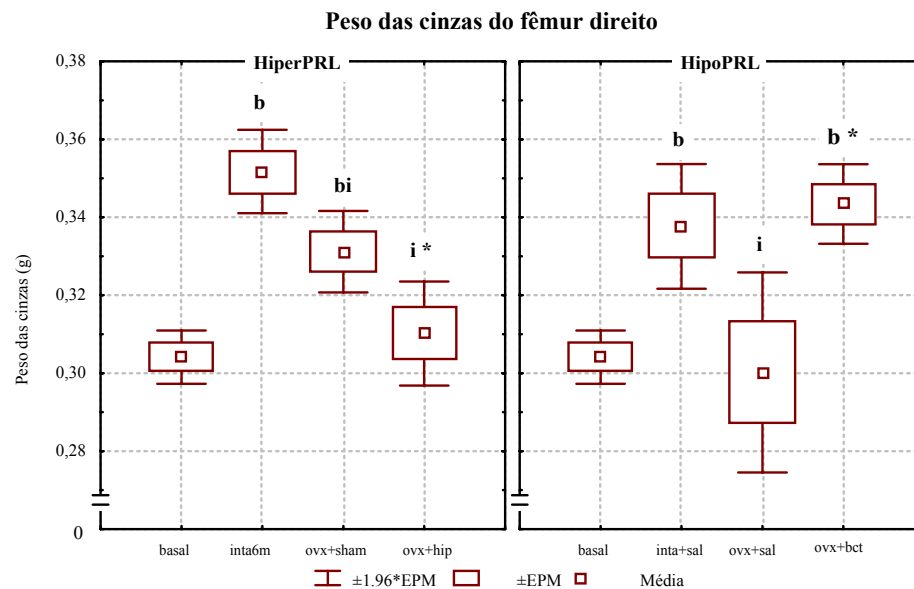


FIGURA 14. Peso das cinzas do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais. $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

A TABELA 6 e as FIGURAS 15, 16 e 17 apresentam os valores do volume ósseo e da densidade óssea e mineral dos fêmures das ratas dos grupos experimentais estudados.

Pode-se observar que o grupo ovx+hip apresentou uma diminuição significativa dos parâmetros densidade óssea e densidade mineral em relação ao grupo ovx+sham. Observa-se, ainda, um aumento significativo do volume ósseo do grupo ovx+bct em relação aos grupos basal e ovx+sal.

TABELA 6. Parâmetros físicos do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média ± EPM).

	Grupos (n)	Volume Ósseo (cm³)	Densidade Óssea (g/cm³)	Densidade Mineral (g/cm³)
	Basal (12)	0,41 ± 0,01	1,81 ± 0,02	0,74 ± 0,01
HiperPRL	Inta 6m (9)	0,46 ± 0,01 ^b	1,79 ± 0,02	0,75 ± 0,02
	Ovx + sham (11)	0,43 ± 0,02	1,84 ± 0,04	0,77 ± 0,03
	Ovx+ hip (13)	0,44 ± 0,01	1,76 ± 0,02 [*]	0,71 ± 0,01 [*]
HipoPRL	Inta + sal (10)	0,44 ± 0,01	1,79 ± 0,03	0,75 ± 0,01
	Ovx + sal (8)	0,40 ± 0,01	1,84 ± 0,02	0,77 ± 0,01
	Ovx + bct (9)	0,46 ± 0,01 ^{b*}	1,78 ± 0,02	0,75 ± 0,02

p ≤ 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ^{*} vs ovx+sal

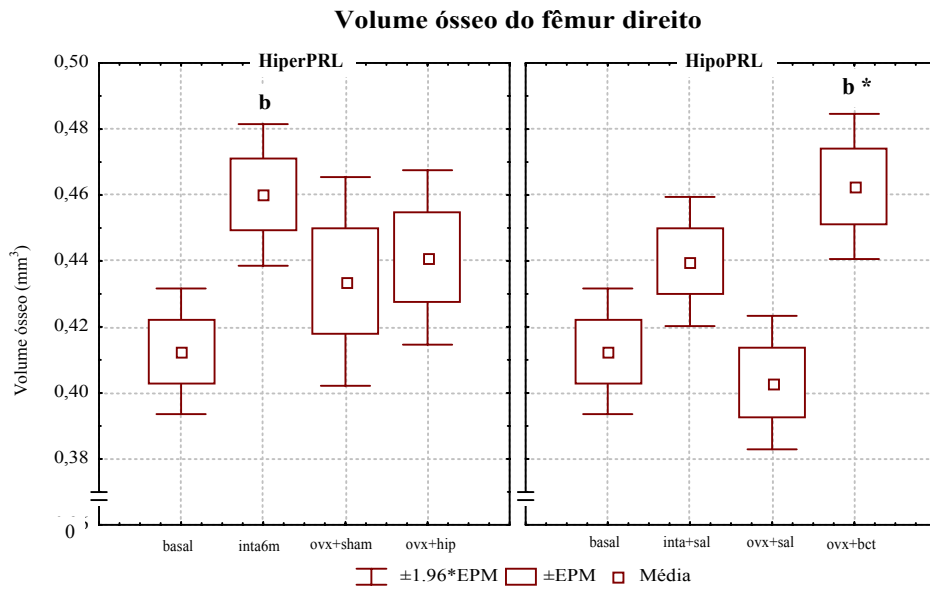


FIGURA 15. Volume ósseo do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ^{*} vs ovx+sal

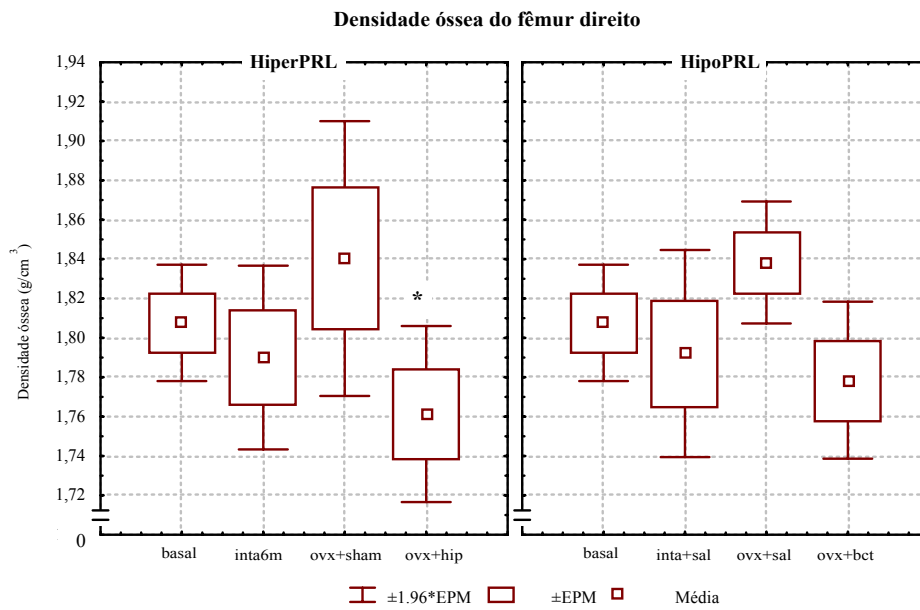


FIGURA 16. Densidade óssea do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^{*} vs ovx+sham

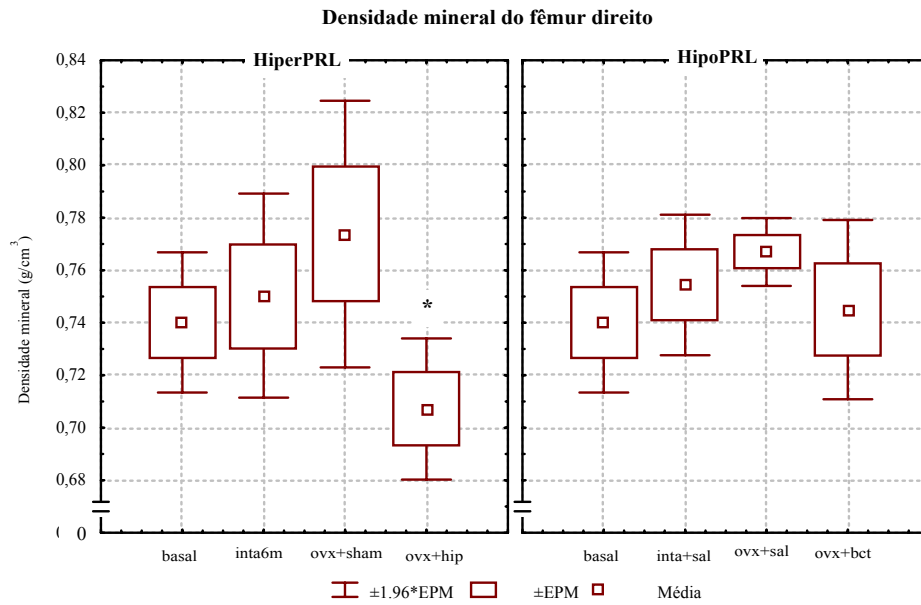


FIGURA 17. Densidade mineral do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: * vs ovx+sham

A TABELA 7 e as FIGURAS 18, 19 e 20 apresentam os dados referentes aos percentuais ósseo de água, de material orgânico e material mineral dos fêmures das ratas dos grupos experimentais.

Pode-se observar que não houveram alterações entre as ratas, tanto do grupo HiperPRL como entre as ratas do grupo HipoPRL, dos parâmetros conteúdo de água e porcentagem de material orgânico do fêmur direito. No entanto, o grupo ovx+hip apresentou uma redução significativa da porcentagem de material mineral, em relação aos grupos inta6m e ovx+sham.

TABELA 7. Propriedades minerais e orgânicas do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Grupo (n)	Conteúdo de Água (%)	Material Orgânico (%)	Material Mineral (%)
	Basal (12)	41,05 \pm 0,55	18,04 \pm 0,17	40,91 \pm 0,41
HiperPRL	Inta 6m (9)	39,86 \pm 0,79	18,28 \pm 0,25	41,86 \pm 0,57
	Ovx + sham (11)	40,18 \pm 0,79	17,88 \pm 0,17	41,94 \pm 0,69
	Ovx+ hip (13)	41,89 \pm 0,64	17,98 \pm 0,25	40,13 \pm 0,42 ^{i*}
HipoPRL	Inta + sal (10)	39,66 \pm 0,51	18,24 \pm 0,26	42,10 \pm 0,42
	Ovx + sal (8)	39,90 \pm 0,40	17,97 \pm 0,23	41,75 \pm 0,62
	Ovx + bct (9)	40,34 \pm 0,70	17,81 \pm 0,19	41,85 \pm 0,53

$p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham

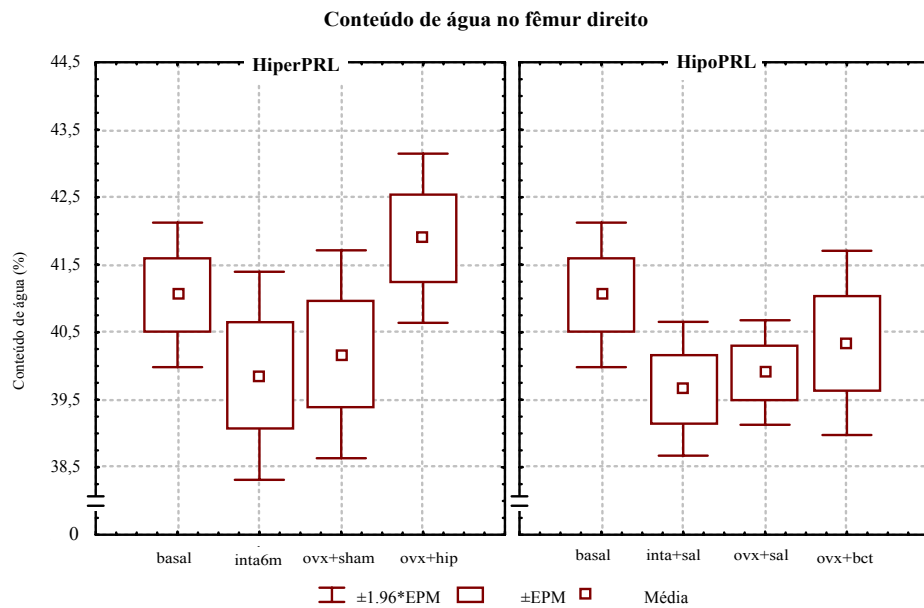


FIGURA 18. Conteúdo ósseo de água do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.

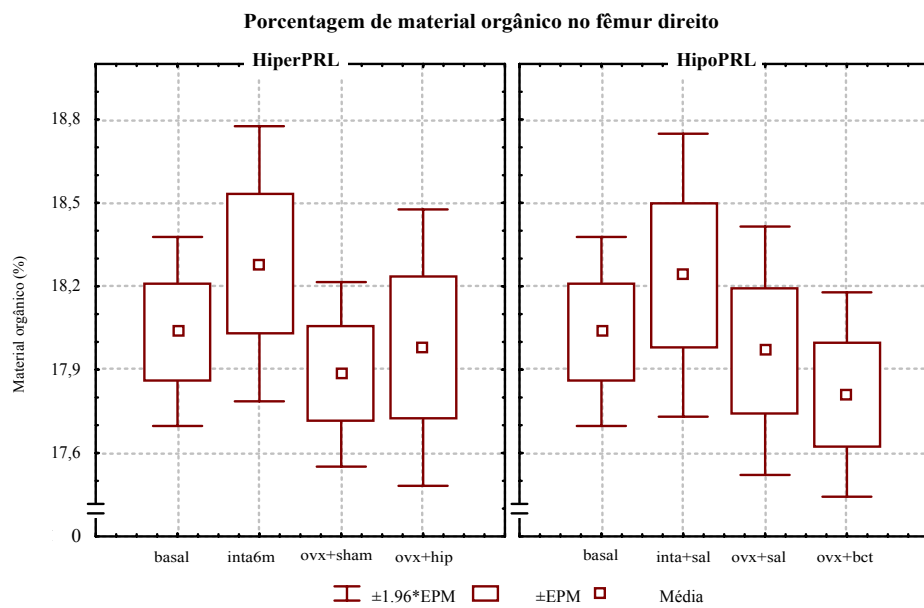


FIGURA 19. Porcentagem de material orgânico do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.

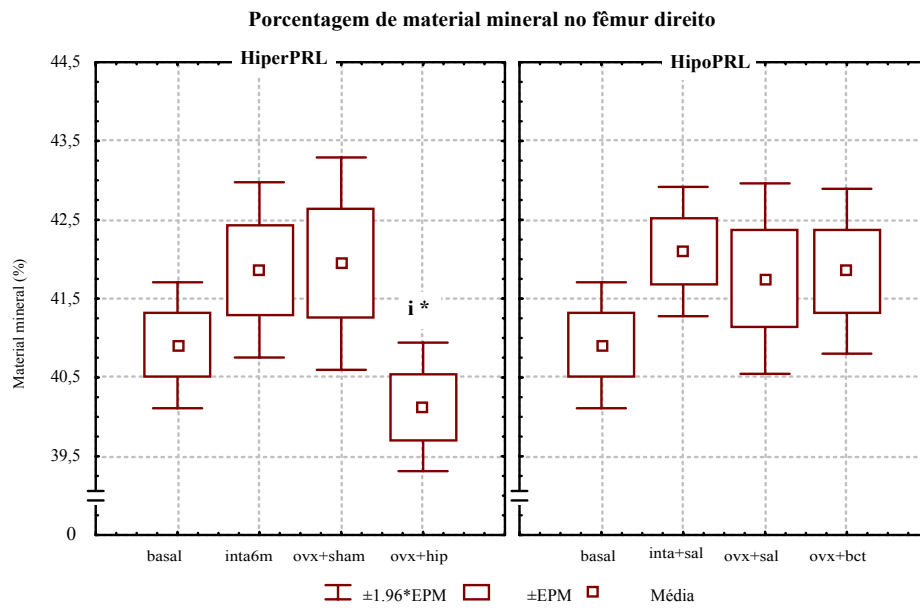


FIGURA 20. Percentual ósseo de material mineral do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ⁱ vs inta6m, * vs ovx+sham

4.4. Parâmetros bioquímicos sérico e do fêmur

As TABELAS 8 e 9 e as FIGURAS 21 a 25 apresentam os valores dos parâmetros bioquímicos do soro e do fêmur. A TABELA 8 e as FIGURAS 21, 22 e 23 mostram as concentrações séricas de cálcio, fósforo e atividade da fosfatase alcalina das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Pode ser observado que todos os grupos apresentaram uma redução significativa da concentração sérica de cálcio, em relação ao grupo basal. O grupo ovx+hip apresentou uma diminuição significativa da concentração sérica de fósforo em relação aos grupos ovx+sham e basal. Em relação à atividade da fosfatase alcalina, o grupo ovx+hip apresentou aumento significativo em comparação aos grupos inta6m e basal.

TABELA 8. Concentrações séricas de cálcio, fósforo e atividade da fosfatase alcalina das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média ± EPM)

	Grupos (n)	Cálcio (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	Ativ. Fosfatase Alcalina (U/l)
	Basal (12)	5,11 ± 0,11	6,40 ± 0,16	44,68 ± 1,87
HiperPRL	Inta 6m (9)	4,74 ± 0,07 ^b	5,49 ± 0,22 ^b	38,43 ± 3,42
	Ovx + sham (11)	4,47 ± 0,05 ^{bi}	6,48 ± 0,23 ⁱ	57,82 ± 4,40 ^{bi}
	Ovx+ hip (13)	4,58 ± 0,06 ^b	5,50 ± 0,16 ^{b*}	60,13 ± 4,57 ^{bi}
HipoPRL	Inta + sal (10)	4,80 ± 0,06 ^b	6,16 ± 0,21	53,08 ± 2,94
	Ovx + sal (8)	4,69 ± 0,04 ^b	5,92 ± 0,28	40,96 ± 3,37
	Ovx + bct (9)	4,72 ± 0,06 ^b	6,02 ± 0,22	59,33 ± 6,38 ^{b*}

p ≤ 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ^{*} vs ovx+sal

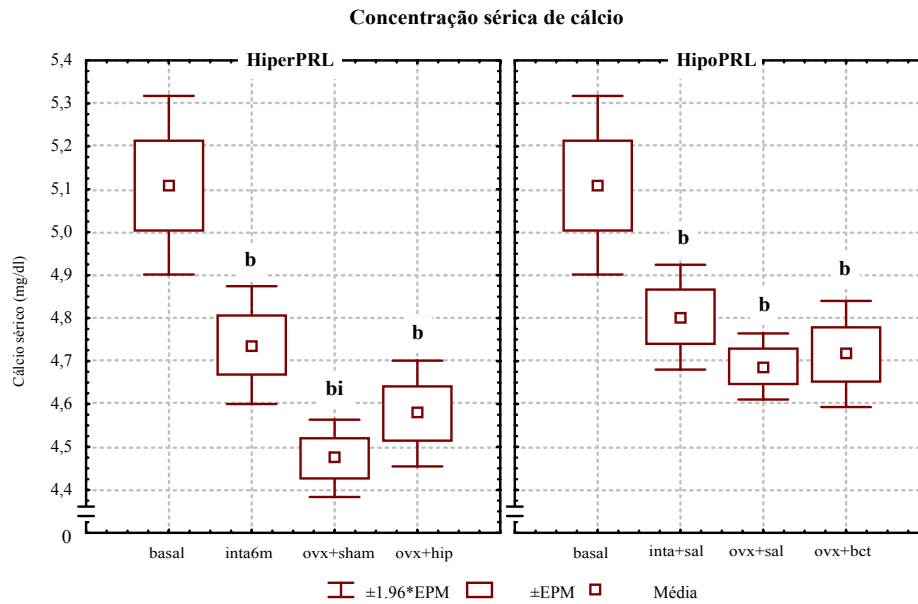


FIGURA 21. Concentração sérica de cálcio das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal

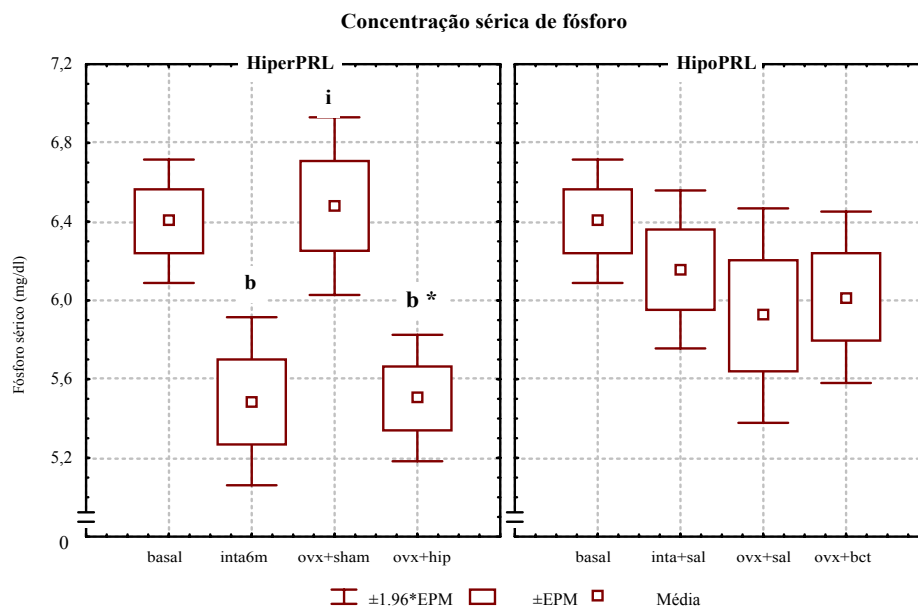


FIGURA 22. Concentração sérica de fósforo das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham

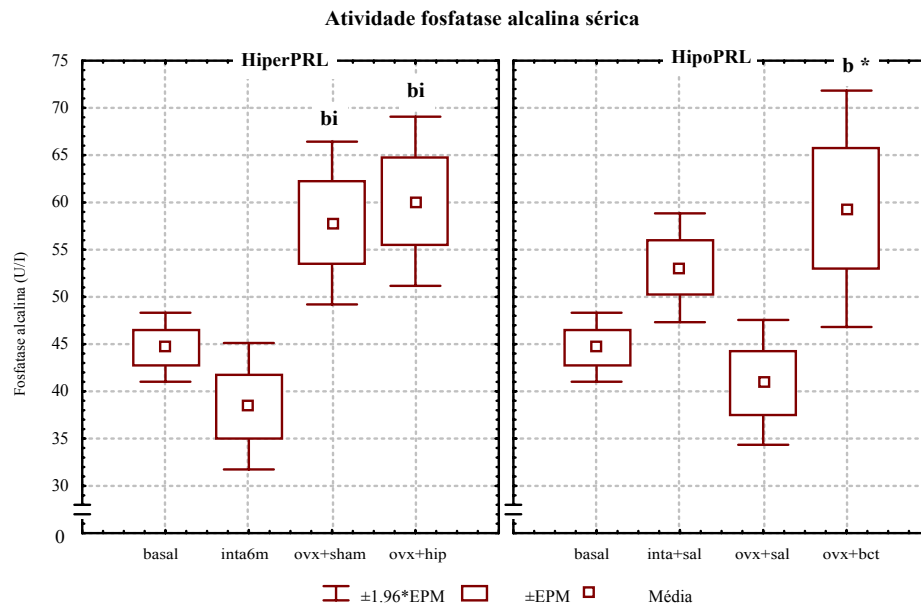


FIGURA 23. Atividade da fosfatase alcalina sérica das ratas dos diferentes grupos experimentais.

$p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ^{*} vs ovx+sal

A TABELA 9 e as FIGURAS 24 e 25 demonstram o conteúdo de cálcio e fósforo do fêmur das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Pode ser observado que houve um aumento significativo do conteúdo de cálcio em todos os grupos (com exceção dos grupos ovx+sham e ovx+sal) e fósforo do fêmur direito em comparação ao grupo basal. O conteúdo de fósforo do fêmur direito dos animais do grupo ovx+hip foi menor em relação aos grupos inta6m e ovx+sham, houve também uma diminuição significativa desse parâmetro dos grupos ovx+sal e ovx+bct comparando-os ao grupo inta+sal.

TABELA 9. Conteúdo de cálcio e fósforo do fêmur direito das ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Grupos (n)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)
	Basal (12)	109,21 \pm 2,89	78,06 \pm 2,01
HiperPRL	Inta 6m (9)	136,23 \pm 4,56 ^b	109,36 \pm 2,65 ^b
	Ovx + sham (11)	120,16 \pm 3,29 ⁱ	109,78 \pm 3,38 ^b
	Ovx+ hip (13)	123,78 \pm 4,24 ^b	96,09 \pm 2,78 ^{bi*}
HipoPRL	Inta + sal (10)	122,90 \pm 6,45 ^b	113,28 \pm 3,22 ^b
	Ovx + sal (8)	118,08 \pm 4,58	103,40 \pm 2,85 ^{bi}
	Ovx + bct (9)	124,32 \pm 3,93 ^b	97,93 \pm 4,92 ^{bi}

p \leq 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, ^{*} vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal

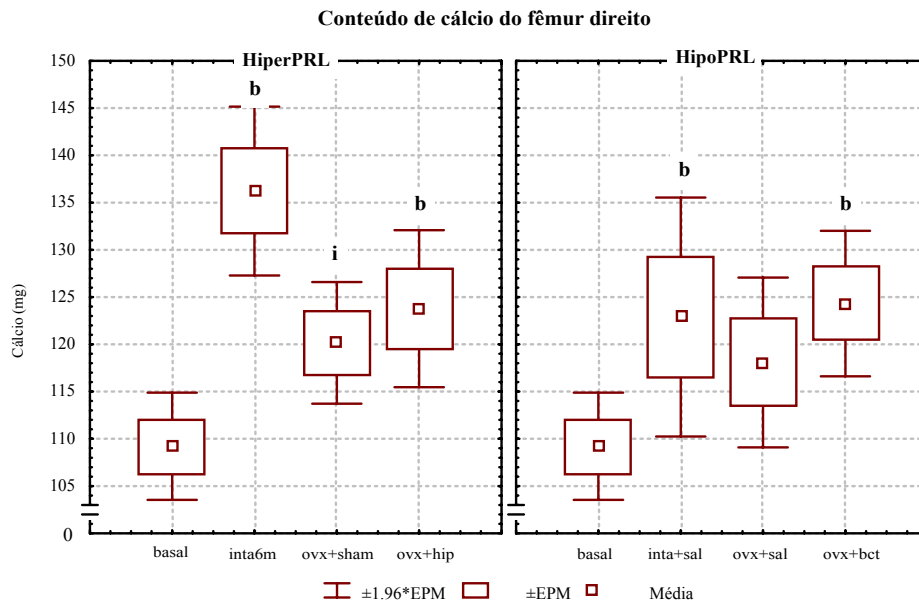


FIGURA 24. Conteúdo de cálcio do fêmur das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal

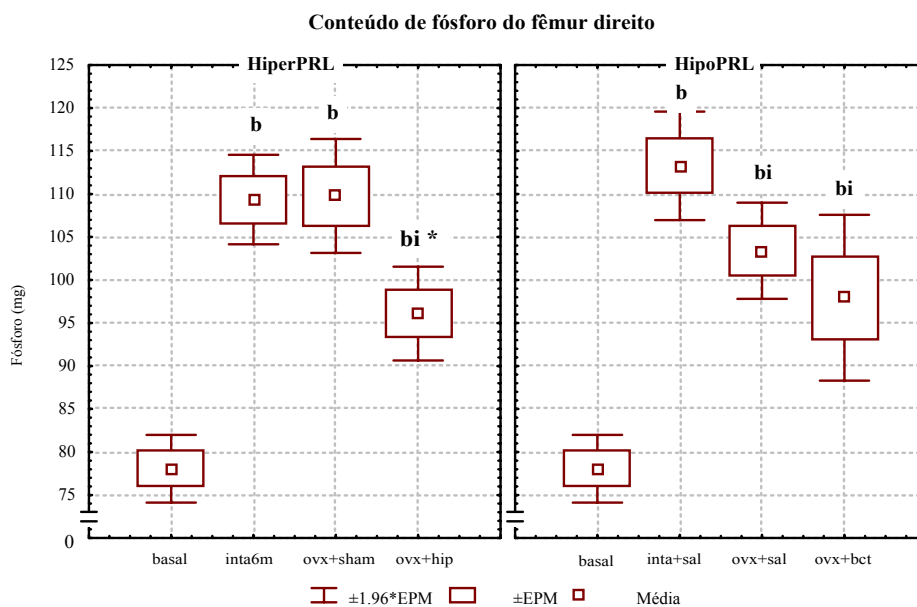


FIGURA 25. Conteúdo de fósforo do fêmur das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m, * vs ovx+sham; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal

4.5. Densitometria óssea da tibia

A TABELA 10 e as FIGURAS 26, 27 e 28 apresentam os valores médios da densidade mineral óssea (BMD), do conteúdo mineral ósseo (BMC) e da área das tíbias direitas das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Pode ser observado que os grupos ovx+sham e ovx+hip apresentaram resultados significativamente menores do parâmetro BMD da tibia direita em relação ao grupo inta6m, ainda em relação a esse parâmetro o grupo ovx+bct apresentou resultados estatisticamente maiores quando comparado ao grupo ovx+sal.

O BMC foi significativo maior no grupo ovx+bct, comparado aos grupos ovx+sal e basal. Com exceção do grupo ovx+sal todos os demais grupos apresentam um aumento significativo da área da tibia direita em comparação ao grupo basal.

TABELA 10. Valores da densidade mineral óssea (BMD), do conteúdo mineral ósseo (BMC) e da área da tibia direita de ratas dos diferentes grupos experimentais (Média \pm EPM)

	Grupos (n)	BMD (g/cm ²)	BMC (g)	Área (cm ²)
	Basal (12)	0,091 \pm 0,001	0,244 \pm 0,004	2,681 \pm 0,023
HiperPRL	Inta 6m (9)	0,093 \pm 0,002	0,259 \pm 0,007	2,773 \pm 0,032 ^b
	Ovx + sham (11)	0,089 \pm 0,001 ⁱ	0,250 \pm 0,005	2,824 \pm 0,033 ^b
	Ovx+ hip (13)	0,086 \pm 0,001 ^{bi}	0,238 \pm 0,004 ⁱ	2,770 \pm 0,018 ^b
HipoPRL	Inta + sal (10)	0,093 \pm 0,001	0,267 \pm 0,006 ^b	2,873 \pm 0,030 ^b
	Ovx + sal (8)	0,089 \pm 0,001	0,237 \pm 0,005 ⁱ	2,648 \pm 0,028 ⁱ
	Ovx + bct (9)	0,094 \pm 0,001 [*]	0,271 \pm 0,004 ^{b*}	2,876 \pm 0,023 ^{b*}

p \leq 0,05. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

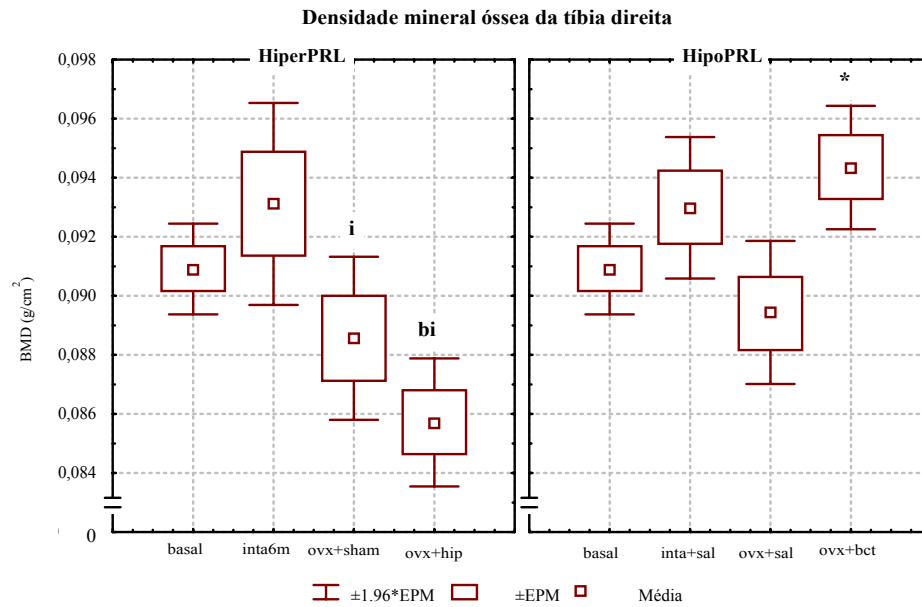


FIGURA 26. Densidade mineral óssea da tíbia das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^{*} vs ovx+sal

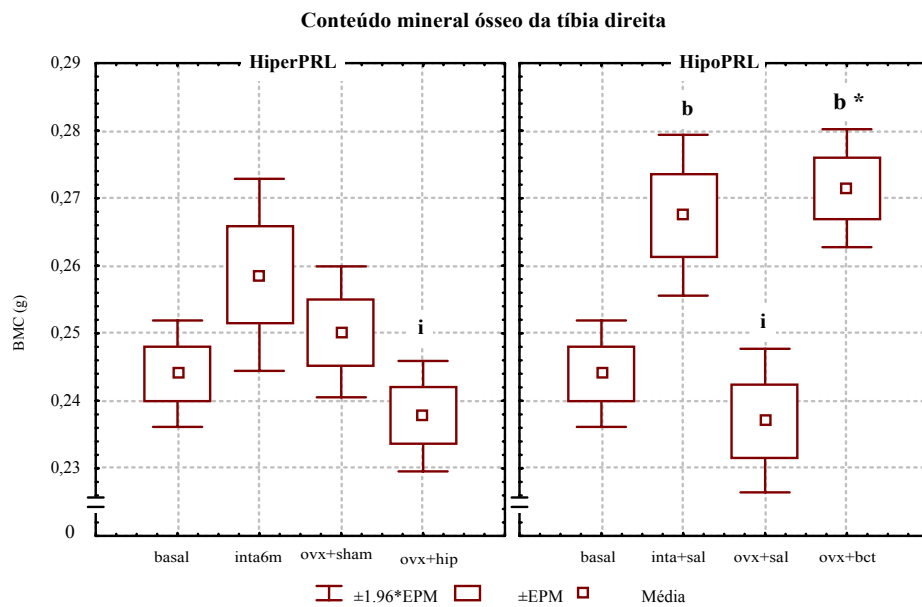


FIGURA 27. Conteúdo mineral ósseo da tíbia das ratas dos diferentes grupos experimentais.
 $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ⁱ vs inta6m; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

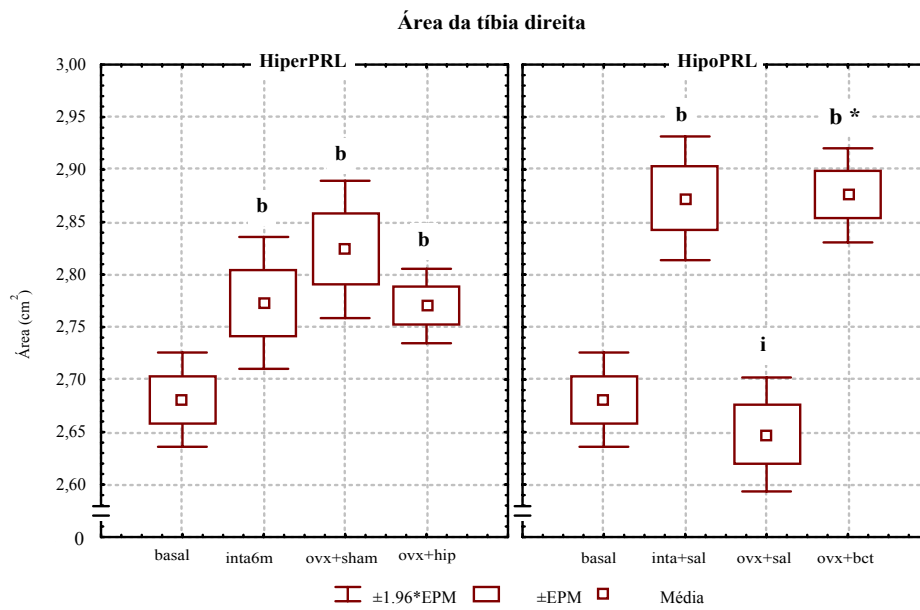


FIGURA 28. Área da tíbia das ratas dos diferentes grupos experimentais. $p \leq 0,05$. No grupo hiperPRL: ^b vs basal; no grupo hipoPRL: ^b vs basal, ⁱ vs inta+sal, ^{*} vs ovx+sal

4.6. Correlação entre prolactina e demais parâmetros

A TABELA 11 se refere à análise de correlação de PRL e os demais parâmetros analisados. Pode-se observar uma correlação positiva significativa entre os níveis de PRL e a atividade da fosfatase alcalina e uma correlação negativa entre os níveis de PRL e a densidade mineral óssea da tíbia.

TABELA 11. Correlação linear entre os níveis de prolactina e demais parâmetros analisados

Variáveis	r	p
Peso corporal inicial	0,117	0,373
Peso corporal final	-0,007	0,959
Variação do peso corporal	-0,068	0,605
Comprimento do fêmur	0,028	0,833
Diâmetro maior	0,096	0,467
Diâmetro menor	0,071	0,588
Força máxima	-0,057	0,666
Rigidez	-0,114	0,386
Capacidade de absorver energia	-0,166	0,205
Peso imerso	-0,063	0,635
Peso úmido	0,041	0,757
Peso seco	-0,068	0,607
Peso cinzas	-0,060	0,649
Volume ósseo	0,095	0,470
Densidade óssea	-0,151	0,251
Densidade mineral	-0,201	0,123
Conteúdo de água	0,244	0,060
Material orgânico	-0,214	0,100
Material mineral	-0,202	0,121
Cálcio sérico	0,102	0,440
Fósforo sérico	-0,238	0,067
Atividade da fosfatase alcalina	0,300	0,020
Cálcio osso	0,042	0,752
Fósforo osso	-0,060	0,648
Densidade mineral óssea (tíbia)	-0,301	0,019
Conteúdo mineral ósseo (tíbia)	-0,220	0,092
Área (tíbia)	-0,036	0,785

p ≤ 0,05

5. DISCUSSÃO

5.1. Propriedades biométricas

Diversos estudos têm mostrado que a OVX provoca aumento significativo do peso corporal (KALU, 1991; DANIELSEN, MOSEKILDE e SVENSTRUP, 1992; HIETALA, 1993; NORDSLETTEN et al., 1994; PENG et al., 1994; KATSUMATA et al., 1995; DANIELSEN e FLYVBJERG, 1996; MONTEAGUDO et al., 1997; PAZ et al., 2001), resultado similar foi encontrado no presente estudo. Todas as ratas que foram submetidas a OVX tiveram um aumento significativo do peso corporal em relação aos respectivos grupos controle, podendo ser observado nas FIGURAS 3 e 4.

Segundo HIETALA (1993), a OVX em ratas leva a um aumento da formação óssea periosteal, o que levaria a um aumento do peso corporal. De acordo com MILLER, BOWMAN e JEE (1995), a OVX é acompanhada por um incremento do ganho de peso corporal, que tende a suprimir a perda do osso trabecular, provavelmente devido ao incremento da carga mecânica sobre o esqueleto, fato não ocorrido no presente trabalho.

Como pôde ser visto nas FIGURAS 3 e 4, houve um aumento significativo do peso corporal tanto nas ratas que receberam o implante de hipófise como nas ratas tratadas com bromocriptina em relação aos respectivos grupos controle de ratas intactas, mas não diferente das ratas OVX. Tem sido relatado um efeito somatogênico da PRL sobre o peso corporal de ratos adultos (PÉREZ-VILLAMIL, BORDIU e PUENTE-CUEVA, 1992), e um pequeno efeito sobre o crescimento corporal após o nascimento (RYNIKOVA et al., 1988), mas ainda há a necessidade de mais pesquisas, pois os trabalhos sobre a ação da PRL sobre o peso corporal parecem inconsistentes.

Em estudo realizado por SILVERIN (1980), foi observado que em pássaros houve um aumento significativo do peso corporal em machos tratados com PRL em relação ao grupo de animais controle. Segundo LOTINUN, LIMLOMWONGSE e KRISHNAMRA (1998), a PRL parece exercer uma ação estimulatória sobre o consumo de ração durante a gestação e lactação, situações em que ocorrem hiperprolactinemia fisiológica.

PIYABHAN, KRISHNAMRA, LIMLOMWONGSE (2000) observaram, que após injeção de bromocriptina (6mg/Kg por dia) em ratas, houve menor ganho de peso e uma tendência à menor ingestão de ração. Em humanos, a bromocriptina provoca efeitos colaterais como náusea (ZARATE, et al., 1978; THORNER, FLUCKIGER e CALNE, 1980) e perda do apetite (EILER et al., 1995), o que poderia explicar a redução do peso corporal, dado que não foi observado no presente estudo.

GONZALEZ, LÓPEZ e AGUILAR (1983) verificaram que a hipoprolactinemia induzida por tratamento com BCT (1mg/kg por dia) não alterou significativamente o peso corporal de ratas Wistar quando comparado ao grupo controle. No entanto, INOUE et al. (1997) relatam que a perfusão de BCT no striatum ventro-lateral aumentou o consumo de ração de maneira dose-dependente em ratos, aumentando o peso corporal.

Em relação ao comprimento do fêmur foi observado no presente estudo (FIGURA 5) um aumento significativo em todos os grupos em relação ao grupo basal, isto ocorreu, pois segundo KALU (1991), o crescimento ósseo em ratos sexualmente maduros se torna mais lento, mas não cessa.

Em estudo realizado por MONTEAGUDO et al. (1997) não foi observada diferença significativa do comprimento do fêmur entre ratas OVX e ratas intactas com 3 meses de idade. O mesmo resultado foi encontrado por KATSUMATA et al. (1995), comparando o comprimento do fêmur de ratas OVX e intactas com 6 meses. No entanto, DANIELSEN e FLYVBJERG (1996), verificaram um aumento significativo do comprimento do fêmur em ratas OVX. Em estudo realizado por HIETALA (1993), não foram encontradas diferenças do comprimento dos fêmures, medidos por RX, mas o diâmetro menor foi um pouco menor, mas não significante, nas ratas OVX em relação ao grupo controle. Ainda de acordo com esse autor, em ratas OVX pode ocorrer aumento dos diâmetros maior e menor devido a uma maior aposição periosteal em resposta à reabsorção endosteal.

A aparente variabilidade observada entre os diversos trabalhos encontrados na literatura em relação aos parâmetros biométricos (peso corporal, comprimento, diâmetro maior e menor do fêmur), talvez possa ser explicada pelo fato de ter sido utilizada ratas sexualmente maduras avaliadas 8 semanas após a ovariectomia (PENG et al., 1994). De acordo com KALU (1991), ratas OVX em torno dos 4 meses de idade podem ou não apresentar aceleração do crescimento linear ósseo, pois a deficiência de estrógeno pode

acarretar em um aumento potencial do crescimento ósseo, aumentando o volume ósseo trabecular metafiseal. Quando esse efeito ocorre, é apenas transitório, pois com o passar do tempo o efeito da deficiência hormonal torna-se dominante sobre o balanço ósseo.

5.2. Propriedades biomecânicas do fêmur

O teste biomecânico é uma importante ferramenta para avaliar a força óssea que é associada a uma susceptibilidade maior ao risco de fraturas, e ainda, para avaliar os efeitos da presença e/ou ausência de hormônios e agentes farmacológicos. Cabe ressaltar que as fraturas constituem o efeito clínico de maior relevância entre os indivíduos acometidos pela osteoporose. O teste biomecânico permite a avaliação da qualidade óssea por meio da análise das propriedades intrínsecas do material biológico.

De acordo com KELLER e SPENGLER (1989), no teste biomecânico de flexão a três pontos, o osso deforma-se por uma mudança do comprimento ou formato angular. O osso deforma-se não mais que aproximadamente 3%. Essa é considerada a amplitude elástica da curva força-deformação porque quando a carga é removida, osso recupera-se e retorna ao formato ou comprimento original. Com a aplicação continuada de carga sobre o tecido ósseo ele atinge seu ponto de deformação, após o qual as fibras externas do tecido ósseo começam a ceder, experimentando microrrupturas e desconexão do material dentro do osso, denominada fase plástica ou não elástica da curva força-deformação.

Nesse estudo, a qualidade óssea foi analisada por meio da força máxima, rigidez e da capacidade de absorção de energia do fêmur, obtidos pelo teste de flexão a três pontos. Segundo LEPOLA et al. (1996), a força máxima não necessariamente coincide com a rigidez, que são determinantes importantes da qualidade óssea.

As reduções da força máxima e da rigidez observadas nesse estudo (FIGURA 8 e 9) após a ovariectomia em relação ao grupo de ratas intactas estão de acordo com dados descritos na literatura (HODGKINSON, 1979; DANIELSEN, MOSEKILDE e ANDREASSEN, 1992; DANIELSEN, MOSEKILDE e SVENSTRUP, 1992; PENG et al., 1994; GIAVARESI et al., 2000). Segundo IKEDA et al. (2001), a deficiência estrogênica aumenta a reabsorção óssea e reduz a massa óssea trabecular, afetando a força biomecânica do osso.

Segundo EINHORN (1996), a capacidade do osso em resistir a fraturas não depende somente da massa óssea e das propriedades materiais, mas também da geometria e da microarquitetura óssea. IKEDA et al. (2001) verificaram que a tanto a densidade óssea como a estrutura trabecular afetam a força biomecânica dos ossos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem parâmetros biomecânicos em ratos hiperprolactinêmicos e hipoprolactinêmicos. No presente estudo, o tratamento com prolactina não foi efetivo para proteger a redução da força máxima e da rigidez do fêmur ocorrida após a ovariectomia. Em contrapartida, os resultados desses parâmetros no grupo ovx+bct foram similares ao do grupo intacto, sugerindo que a prolactina possa ter um efeito direto e/ou indireto sobre o tecido ósseo, como pode ser visualizado nas FIGURAS 8 e 9. A ausência de PRL promoveu uma ação protetora contra a espoliação óssea, melhorando a resistência óssea, talvez em função de uma melhora da estrutura geométrica e microarquitetura óssea, corroborando com os dados obtidos com os parâmetros físicos (peso da cinza) (FIGURA 14) e a avaliação da densitometria óssea da tíbia (BMD e BMC) (FIGURAS 26 e 27).

De acordo com o presente estudo, diversos estudos sugerem que tanto a hiperprolactinemia fisiológica como a patológica estão associadas com alterações fisiológicas do osso. Tumor induzindo hiperprolactinemia em humanos (GREENSPAN et al., 1986; KLIBANSKI e GREENSPAN, 1986) e ratos (ADLER et al., 1991) é associado com osteopenia. Elevação da PRL pela administração de drogas neurolépticas também resultam em osteopenia (DICKSON e GLAZER, 1999); período prolongado de lactação resulta em significativa perda de massa óssea (CROSS, HILLMAN e KRAUSE, 1995; SOWERS et al., 1996; BRONDINO, 2002); e ainda o envelhecimento é correlacionado com aumento de PRL e perda de massa óssea (VEKMANS e ROBYN, 1975; MELTON et al., 1992). KOLOSZAR, GELLEN e KOVACS (1997), verificaram que o risco de osteoporose pode ser predito pelos níveis de PRL.

De acordo com pesquisas realizadas por KLIBANSKI, NEER e BEITINS (1980) e SCHLECHTE, SHERMAN e MARTIN (1983), a supressão gonadal associada a quaisquer condições que levam a um quadro de hiperprolactinemia pode ter uma importante contribuição para a perda de massa óssea na pré menopausa e subsequente risco para a osteoporose em um grande número de mulheres.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre as ratas ovariectomizadas, hiperprolactinêmicas e hipoprolactinêmicas e os respectivos grupos controles em relação ao parâmetro capacidade de absorção de energia, que se refere à quantidade de energia necessária para causar fratura. No entanto, PENG et al. (1994) verificaram em ratas Sprague-Dawley (12 semanas de idade), uma redução significativa da capacidade de absorver energia seis semanas após a ovariectomia, resultado similar foi encontrado por NORDSLETTEN et al. (1994).

5.3. Propriedades físicas do fêmur

Pôde ser verificado nas FIGURAS 11 a 15, o efeito da idade das ratas nos parâmetros físicos do fêmur (peso imerso, úmido, seco e das cinzas e volume ósseo), constatado pelo aumento desses parâmetros nos grupos de ratas intactas, em relação ao grupo basal.

No presente estudo foi verificada uma diminuição dos pesos ósseos (peso seco e peso das cinzas do fêmur direito) das ratas OVX (ovx+sham e ovx+sal) em relação aos respectivos grupos controle de ratas intactas, conforme demonstrado nas FIGURAS 13 e 14 respectivamente. Esses dados estão de acordo com os resultados observados por NORDSLETTEN et al. (1994), que verificaram diminuição do peso seco e das cinzas do fêmur de ratas OVX e com os resultados do estudo realizado por BARENGOLTS et al. (1990), no qual foi observada uma redução do conteúdo ósseo de cinza e cálcio após a ovariectomia em ratas Sprague-Dawley idosas, indicando uma significativa perda óssea.

A diminuição do peso seco e do peso das cinzas do fêmur ocorrida no presente estudo nos fêmures das ratas OVX, levaram à diminuição do conteúdo de cálcio do fêmur (FIGURA 24) e do cálcio sérico (FIGURA 21). Esses dados, corroboram os achados da densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo da tíbia (FIGURAS 26 e 27).

No entanto, não houve diferença significativa dos demais parâmetros físicos (volume ósseo, peso do fêmur imerso em água, peso úmido e densidade óssea) nas ratas OVX em relação às ratas intactas (FIGURAS 11, 12, 15 e 16). HIETALA (1993), observou que a densidade óssea ($p=0,03$) e o volume ($p=0,06$) do fêmur esquerdo dos

animais do grupo OVX foram menores do que o do grupo controle. A pequena diferença entre as densidades do fêmur entre ratos OVX e controle pode ser explicada pela grande porção de osso cortical no fêmur, pois a OVX promove uma perda rápida de osso trabecular metafisial da tíbia e do fêmur devido ao desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea. KALU (1991) e NORDSLETTEN et al. (1994) verificaram diminuição significativa do volume do fêmur de ratas OVX em relação a ratas intactas.

Segundo KATSUMATA et al. (1995), o aumento da força e da rigidez do osso não necessariamente significa uma melhora das propriedades biomecânicas do tecido ósseo. Esses autores observaram uma correlação positiva entre a densidade óssea e a força máxima em ossos trabeculares.

Nas ratas hiperprolactinêmicas foi verificada uma diminuição do peso do fêmur imerso em água, peso das cinzas e porcentagem de material mineral do fêmur em relação ao grupo ovx+sham (FIGURAS 11, 14 e 20). Com a diminuição dos valores desses parâmetros houve uma diminuição do conteúdo de fósforo do fêmur (FIGURA 25) e concentração sérica de fósforo (FIGURA 22), no entanto não houve modificações do conteúdo de cálcio do fêmur (FIGURA 24). Esses dados corroboram os valores obtidos (BMC e BMD) por meio da densitometria óssea da tíbia (FIGURAS 26 e 27).

Em contrapartida, com a administração de bromocriptina houve um aumento do peso do fêmur imerso em água, peso úmido, peso seco e peso das cinzas dos fêmures dos animais em relação aos grupos ovx+sal e inta+sal (FIGURAS 11 a 14), levando a um aumento significativo do volume ósseo (FIGURA 15), o que interferiu positivamente sobre a qualidade biomecânica do fêmur, constatado pela força máxima e rigidez do fêmur (FIGURA 8 e 9) e sobre os parâmetros de densitometria óssea, ou seja, densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo (FIGURAS 26 e 27).

5.4. Densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo do fêmur e da tíbia

O risco de fratura em mulheres idosas, em parte, é relacionada à densidade mineral óssea (BMD). A BMD reflete o acúmulo do pico de massa óssea na manutenção ou perda de massa óssea, e é altamente correlacionada com a força óssea. A acurácia para a aplicação do DEXA em ratos tem sido bem avaliada por muitos pesquisadores. MONTEAGUDO et al. (1997) verificaram que 1 mês após a OVX é

suficiente para promover a osteopenia e a perda óssea que se segue pode ser detectada pela densitometria óssea.

Segundo LEPOLA et al (1996), o conteúdo mineral ósseo (BMC) é um dos determinantes da força biomecânica do osso. Para a determinação da BMD e do BMC pode-se utilizar meios indiretos, como o Princípio de Arquimedes e/ou diretos como a densitometria óssea. No presente estudo esses parâmetros foram determinados seguindo o Princípio de Arquimedes para a análise do fêmur direito e para a avaliação da tíbia direita foi utilizado a densitometria óssea.

Não foi verificada diferença significativa em relação a esses parâmetros entre os grupos de ratas intactas e ratas do grupo basal. Foi observado nesse estudo que houve uma diminuição significativa da densidade mineral óssea (BMD) da tíbia nas ratas ovariectomizadas (ovx+sham) do grupo HiperPRL (FIGURA 27), porém houve uma grande variabilidade nos resultados desse parâmetro em relação à análise do fêmur (FIGURA 17). E ainda, pode-se observar uma diminuição do BMC da tíbia das ratas ovx+sal do grupo HipoPRL (FIGURA 28), fato não observado na porcentagem de material orgânico e material mineral do fêmur (FIGURAS 19 e 20). Os resultados obtidos por meio da densitometria óssea da tíbia estão de acordo com os dados encontrados na literatura e corroboram os resultados dos parâmetros biomecânicos (força máxima e rigidez) do fêmur.

MONTEAGUDO et al. (1997), observaram uma diminuição do BMC e da BMD do fêmur de ratas OVX (com 100 dias), em comparação a ratas intactas da mesma idade. KATSUMATA et al. (1995), observaram diminuição do BMC do fêmur no grupo de ratas OVX em relação ao grupo intacta, no entanto não houve diferença da força de fratura e da rigidez entre esses grupos. SØGAARD et al. (1997) não verificaram alterações da BMD em ratas OVX. PAZ et al. (2001) verificaram diminuição da BMD no fêmur (porção distal) após 6 semanas de OVX. NORDSLETTEN et al. (1994) verificaram uma diminuição em torno de 40% em ratas OVX no BMC e 43% no BMD, De acordo com WESTERLIND et al. (1999), após a OVX se observa perda significativa de conteúdo mineral ósseo principalmente no osso trabecular.

O fato de ter ocorrido uma diminuição significativa destes parâmetros no presente estudo com a tíbia, mas não no fêmur, pode ser devido à constituição óssea diferente da tíbia e do fêmur. É conhecido que a tíbia é constituída preponderantemente

por osso trabecular e o fêmur predominantemente por osso cortical. De acordo com WESTERLIND et al. (1999), a perda da massa óssea em ratas OVX é associada com aumento do turnover ósseo, porém, a perda óssea não é uniforme, o osso trabecular sofre um risco maior do que o osso cortical. Segundo RAISZ (1999), após a OVX ocorre rápida perfuração das trabéculas ósseas pelos osteoclastos, o que aumenta os espaços existentes entre elas. Para WESTERLIND et al. (1999) regiões com predominância de osso cortical não sofrem alterações significativas por serem menos sensíveis à queda do hormônio ovariano. De acordo com KALU (1991), as razões para esta aparente resistência do osso cortical à OVX em ratas sexualmente maduras ainda não está totalmente elucidado.

A diminuição dos parâmetros da BMD (fêmur e tíbia) e do BMC da tíbia e porcentagem de material mineral do fêmur (FIGURAS 17, 20, 26 e 28), ocorrida nas ratas hiperprolactinêmicas (ovx+hip) em relação aos grupos controle, estão de acordo com os resultados encontrados na literatura.

SCHLECHTE, WALKNER e KATHOL (1992), HONDA et al. (1998), TOJO et al. (1998), POLATTI et al. (1999), SHAARAWY et al. (1999), COSS et al. (2000), MEANEY e O'KEANE (2002), MATSUYAMA et al. (2003) verificaram a associação da hiperprolactinemia com diminuição da densidade mineral óssea e conteúdo de mineral ósseo. SCHLECHTE, WALKNER e KATHOL (1992), verificaram que mulheres hiperprolactinêmicas tinham uma BMD menor tanto do rádio como das vértebras em relação às mulheres saudáveis. SHAARAWY et al. (1999) observaram diminuição da BMD lombar em mulheres hiperprolactinêmicas e amenorréicas. HONDA et al. (1998), TOJO et al. (1998) e POLATTI et al. (1999) verificaram diminuição da BMD em L2-L4 de mulheres gestantes e lactantes (hipoestrogenemia e hiperprolactinemia fisiológica), sugerindo que a lactação causa um aumento do metabolismo ósseo.

No entanto, o mecanismo de perda óssea que ocorre em mulheres hiperprolactinêmicas ainda não está definido claramente. Muitos autores atribuem a diminuição da BMD e BMC em mulheres e/ou ratas hiperprolactinêmicas à diminuição dos níveis de estrógeno circulantes. Porém, outros autores acreditam que a PRL possa exercer um efeito direto sobre o tecido ósseo, independente dos níveis estrogênicos. No

presente estudo para o controle dos níveis de estrógeno, as ratas foram ovariectomizadas.

COSS et al. (2000) verificaram que o tratamento do hipogonadismo, mais do que a supressão dos níveis de PRL, é associado com aumento da massa óssea, em mulheres hiperprolactinêmicas e com hipogonadismo. Esses achados sugerem que os esteróides sexuais são cruciais na manutenção da integridade do esqueleto. ADLER et al. (1998), verificaram diminuição da BMD em mulheres hiperprolactinêmicas, com uma correlação positiva entre BMD e níveis séricos de estradiol, mas não com os níveis de PRL, sugerindo que a osteoporose em pacientes com hiperprolactinemia ocorra mais por ação da PRL em induzir o hipogonadismo do que um efeito direto da PRL no osso. KLIBANSKI e GREENSPAN (1986) observaram que mulheres hiperprolactinêmicas que eram eumenorréicas tinham uma densidade óssea maior do que as mulheres que eram hiperprolactinêmicas e amenorréicas, sugerindo uma resposta diferenciada, de acordo com a estimulação estrogênica.

Segundo CLEMENT-LACROIX et al. (1999), a perda da BMD envolve em parte a hipoestrogenemia, mas um efeito direto da PRL não pode ser descartado. Estudos clínicos (CROSS, HILLMAN e KRAUSE, 1995; KOLOZAR, GELLEN e KOVACS, 1997; LOPEZ et al., 1997; DI SOMMA et al., 1998) demonstraram uma correlação entre níveis plasmáticos de PRL com osteopenia observados durante lactação, gestação e estágios pós-menopausa, corroborando os achados do presente estudo, no qual observou-se uma correlação negativa entre a BMD da tíbia e níveis plasmáticos de PRL ($p=0,019$; $r=-0,301$) (TABELA 11).

ROZHINSKAIA et al. (1992), verificaram redução do BMC da coluna torácica em mulheres hiperprolactinêmicas e não verificaram correlação com os níveis séricos de PRL e tempo de amenorréia. Nesse mesmo trabalho foi verificada redução dos níveis séricos de osteocalcina, que reflete a função osteoblástica e os autores concluíram que a osteopatia em mulheres hiperprolactinêmicas com hipogonadismo é devido a uma redução da formação óssea e não pela redução dos níveis de estrógeno. Em um estudo longitudinal desenvolvido por SCHLECHTE, WALKNER e KATHOL (1992), foi observada uma menor massa óssea das vértebras e rádio de mulheres hiperprolactinêmicas e nesse estudo a restauração da função gonadal não foi associada com normalização da massa mineral.

SCHLECHTE, SHERMAN e MARTIN (1983), compararam o BMC do rádio em mulheres normais e mulheres com tumor de hipófise, que desenvolveram um quadro clínico de hiperprolactinemia e amenorréia e mulheres com hiperprolactinemia e eumenorréia. Esses autores constataram que o BMC das mulheres hiperprolactinêmicas em ambos os grupos era significativamente menor em relação às mulheres normais, sugerindo que a PRL pode exercer um efeito direto no osso, independente da resposta estrogênica.

DI SOMMA et al. (1998) verificaram que 80% dos pacientes hiperprolactinêmicos avaliados tinham redução de BMD lombar e 30% no colo femoral, demonstrando que o osso trabecular é mais atingido do que o osso cortical em situações de hiperprolactinemia.

Nas ratas hipoprolactinêmicas observou-se um aumento significativo da BMD e da BMC na tíbia em relação ao grupo ovx+sal (FIGURA 26 e 27), esses parâmetros corroboram os achados do teste de flexão a três pontos realizado no fêmur (FIGURA 8 e 9) e os dados existentes na literatura.

CARACENI et al. (1985), KLIBANSKI e GREENSPAN (1986) e TORRING et al. (1993) verificaram um aumento da BMD do rádio e vértebras de mulheres hiperprolactinêmicas após tratamento com BCT, fato não observado no presente estudo em relação ao fêmur. KLIBANSKI e GREENSPAN (1986) demonstraram que após tratamento com bromocriptina, houve uma melhora do BMC do rádio. DI SOMMA et al. (1998), verificaram que após tratamento com BCT houve restauração da função gonadal e aumento da BMD vertebral em mulheres hiperprolactinêmicas. POLATTI et al. (1999) verificaram que o tratamento com BCT e normalização dos níveis de PRL foi benéfico para o BMC e BMD das vértebras.

MORIMOTO et al. (2000) observaram que a administração de BCT induzindo hipoprolactinemia, levou a um aumento da massa óssea pela indução da formação de osso cortical em ratas OVX. Segundo esses autores a diminuição dos níveis de PRL causa maior formação óssea na superfície pericortical e previne a reabsorção óssea na superfície endocortical devido à deficiência de estrógeno, resultando em um aumento da massa cortical.

5.5. Parâmetros bioquímicos sérico e do fêmur

As variáveis bioquímicas foram analisadas nesse estudo por meio das concentrações séricas de cálcio e fósforo, pelo conteúdo de cálcio e de fósforo no fêmur e pela atividade da enzima fosfatase alcalina.

No presente estudo, houve uma diminuição da concentração sérica de cálcio em todos os grupos experimentais em relação ao grupo basal, mostrando um efeito da idade da rata em relação ao metabolismo do cálcio (FIGURA 21). No grupo ovx+sham foi observada uma diminuição da concentração sérica de cálcio em relação ao grupo intacta (FIGURA 21) e um aumento significativo da concentração sérica de fósforo em relação ao grupo intacta (FIGURA 22). Em estudo realizado por HIETALA (1993), não houve alteração da concentração sérica de cálcio em ratas OVX, resultado similar ocorreu no grupo ovx+sal do presente estudo. Segundo KATSUMATA et al. (1995), redução do cálcio sérico refletiria a redução da reabsorção óssea.

No entanto, foi observada uma diminuição da concentração sérica de fósforo do grupo ovx+hip, em relação ao grupo ovx+sham e ao grupo basal (FIGURA 22). Não houve alteração nesse parâmetro entre os animais do grupo hipoPRL.

HIETALA (1993) observou que a concentração sérica de fósforo foi menor em relação ao grupo controle, oposto ao observado no presente estudo. HIETALA (1993) atribui essa redução de fósforo a mecanismos secundários à elevação do PTH. KALU (1991) e KATSUMATA et al. (1995), não observaram alterações da concentração sérica de fósforo após a OVX.

Segundo HIETALA (1993), a OVX induz uma alteração da homeostase do cálcio e fósforo. De acordo com KALU (1991), há uma certa discrepância entre pesquisas realizadas em relação aos níveis séricos de cálcio e fósforo, devido à deficiência de hormônios sexuais, que pode ocorrer devido a fatores que não são relacionados à etiologia da osteoporose.

No grupo de ratas hiperprolactinêmicas e das ratas hipoprolactinêmicas não houve alteração da concentração sérica de cálcio em relação aos respectivos grupos controles (FIGURA 21). Resultado diferente foi encontrado por PIYABHAN, KRISHNAMRA e LIMLOMWONGSE (2000), verificaram que ratas

hiperprolactinêmicas (implante de 2 glândulas hipófise) exibiram aumento de 16% no conteúdo do cálcio sérico.

LOTINUM et al. (2003) verificaram que a BCT diminuiu a reabsorção de cálcio no fêmur e na tíbia. A supressão do turnover do cálcio ósseo no grupo de ratas tratadas com BCT foi relacionada por uma diminuição significativa na deoxipiridinolina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea, e pelos dados da histomorfometria que mostraram mudanças indicativas de supressão de reabsorção e formação óssea. LOTINUN, LIMLOMWONGSE e KRISHNAMRA (1998) observaram elevada concentração sérica de cálcio em ratas tratadas com bromocriptina.

A fosfatase alcalina é um indicador de formação óssea, pois promove o depósito de cálcio no osso. Houve um aumento desse parâmetro no grupo de ratas ovariectomizadas (ovx+sham) do grupo HiperPRL em relação aos grupos inta6m e basal (FIGURA 23). Este resultado está de acordo com os encontrados nos estudos de KALU (1991) e KATSUMATA et al. (1995), que sugerem que a menor atividade da fosfatase alcalina nas ratas intactas, pode estar relacionada à redução do turnover ósseo. No entanto, nas ratas ovx+sal do grupo HipopRL foi observada uma diminuição neste parâmetro em relação ao grupo inta+sal (FIGURA 23).

Foi observado que o implante das duas hipófises na cápsula renal promoveu um aumento da atividade da fosfatase alcalina, sugerindo um aumento do turnover ósseo (FIGURA 23), foi observado também uma correlação positiva entre níveis plasmáticos de PRL e atividade da fosfatase alcalina ($p=0,02$; $r=0,30$) (TABELA 11). COSS et al. (2000) verificaram que altos níveis de PRL parecem influenciar a diferenciação celular óssea, pois observaram que nessa condição os osteoblastos expressaram altas concentrações de fosfatase alcalina durante a formação do osteóide.

SHAARAWY et al. (1999), verificaram que mulheres que sofriam de hiperprolactinemia e amenorréia, tinham níveis aumentados de atividade da fosfatase alcalina, associados com diminuição da BMD vertebral, medida por DEXA. O tratamento com bromocriptina restaurou a atividade da fosfatase alcalina a níveis normais. Esses autores concluem que a hiperprolactinemia associada à deficiência de estrogênica acarreta um aumento da reabsorção óssea, que é associada a uma diminuição da BMD vertebral, levando as pacientes a um risco maior de desenvolvimento de osteoporose.

Em estudo realizado por NORDSLETTEN et al. (1994) foi observado que a OVX resulta em diminuição do conteúdo de cálcio e fósforo no fêmur. No presente estudo verificou-se que houve uma diminuição do conteúdo de cálcio no fêmur das ratas ovx+sham em relação aos animais inta6m do grupo HiperPRL (FIGURA 24) e uma diminuição do conteúdo de fósforo nos fêmures das ratas ovx+sal em relação às ratas inta+sal do grupo HipoPRL.

As ratas do grupo ovx+hip e do grupo ovx+bct apresentaram respostas similares em relação ao conteúdo de cálcio (aumento significativo em relação ao grupo basal) (FIGURA 24) e ao conteúdo de fósforo do fêmur (diminuição significativa em relação aos respectivos grupos controle) (FIGURA 25).

De acordo com COSS et al. (2000), a PRL acelera o turnover ósseo, levando à diminuição do BMC. Segundo ADLER et al. (1991), níveis elevados de PRL exerceria a ativação de processos metabólicos, como por exemplo, a homeostase do cálcio. ADLER et al. (1998) reportaram que ratas OVX e hiperprolactinêmicas (implante de células tumorais, induzindo níveis elevados de PRL) excretam mais cálcio na urina. O excesso de excreção de cálcio urinário parece ser devido a um efeito direto da PRL sobre a reabsorção do cálcio renal. A reabsorção do cálcio no túbulo renal é significativamente reduzido nesses ratos, com conseqüente aumento da excreção de cálcio urinário, o que poderia explicar a diminuição da densidade óssea ocorrida nesses animais.

CLEMENT-LACROIX et al. (1999), verificaram que a administração prolongada de PRL diminui a excreção de cálcio em ratas maduras e aumenta a formação óssea e o conteúdo de cálcio na tíbia em ratas em crescimento. A PRL aumenta o turnover do cálcio em ossos trabeculares e compactos de ratas maduras. Ratas jovens respondem à PRL pelo aumento do depósito de minerais no osso, enquanto ratas mais velhas aumentam a liberação de cálcio. As análises dos parâmetros do metabolismo ósseo, turnover ósseo, formação e reabsorção óssea mostraram um aumento durante situações de hiperprolactinemia.

PIYABHAN, RISHNAMRA e LIMLOMWONGSE (2000) verificaram que na ausência de PRL, a absorção e retenção de cálcio foram prejudicadas, sugerindo que a PRL é essencial para iniciar ou manter a eficiência de absorção e retenção intestinal de cálcio. Medidas de conteúdo de cálcio em ratos mostraram que a presença de PRL

endógena previne a perda de cálcio do osso trabecular. Porém como a PRL afeta o metabolismo ósseo não é conhecido até o presente. Outro aspecto interessante da ação da PRL verificado por esses autores é que a PRL poderia exercer uma ação bifásica, demonstrada em ratas com 5 semanas. Enquanto níveis baixos de PRL ($7,05 \pm 0,12$ ng/ml) aumentaram a absorção e retenção de cálcio, altos níveis plasmáticos de PRL, decorrente de glândulas implantadas ($91,69 \pm 2,88$ ng/ml) diminuiu o mesmo parâmetro. Essa ação bifásica da PRL tem sido relatada na esteroidogênese e proliferação linfocitária. Esse fenômeno pode ser explicado baseado na seqüência de dimerização de receptores de PRL. De acordo com KUO, COSS e WALKER (1998), em altas concentrações mais de 1 complexo receptor-hormônio são formados, reduzindo a resposta celular e então o hormônio age como um antagonista.

Medidas de densidade óssea e força biomecânica são características importantes para avaliar o tecido ósseo. A OVX em ratas é um modelo bastante usado, levando a alguns eventos associados ao desenvolvimento da osteoporose pós menopausal em humanos. Pode ser observado nesse trabalho, pela redução da força máxima, rigidez, peso das cinzas do fêmur, conteúdo do cálcio do fêmur, cálcio sérico, BMD e BMC da tíbia, que após a ovariectomia em ratas, houve um decréscimo rápido da massa óssea e variações da atividade celular óssea.

A hipoestrogenemia associada com hiperprolactinemia é comumente assumida ser a principal causa de osteopenia em mulheres pré menopausal. No entanto, o papel dos receptores de PRL no metabolismo ósseo e os mecanismos fisiológicos pelo qual a PRL regula o remodelamento ósseo precisam ainda ser determinados. Os resultados desse estudo demonstram que níveis mais baixos de PRL mantiveram as propriedades do osso após OVX pela prevenção da perda de mineral ósseo em ratas maduras.

O estudo mostra ser de grande importância para cientistas e clínicos entender as desordens ósseas observadas durante a hiperprolactinemia patológica e fisiológica, como na gestação e lactação. A diminuição da BMD em pacientes com hiperprolactinemia sugere que a PRL pode exercer um efeito direto no osso, levando à osteoporose e deve ser outra indicação para o tratamento precoce de tumores hipofisários.

6. CONCLUSÕES

- a ovariectomia foi eficaz para promover a osteopenia em ratas, efeito que pode ser constatado pelas variáveis analisadas;
- o implante de hipófise na cápsula renal constitui um modelo experimental eficaz para promover a hiperprolactinemia em ratas;
- a bromocriptina foi eficaz em promover a hipoprolactinemia em ratas;
- aparentemente houve uma perda maior de massa óssea na tíbia em relação ao fêmur;
- houve um maior ganho de peso corporal nas ratas ovariectomizadas, em relação às ratas intactas;
- a hiperprolactinemia, desencadeada pelo implante de duas hipófises na cápsula renal, promoveu uma diminuição do peso das cinzas e da porcentagem de material mineral do fêmur, e reduziu a densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo da tíbia;
- a diminuição dos níveis de PRL, promovida pela administração de bromocriptina, manteve os parâmetros biomecânicos do fêmur (rigidez e força máxima) e os parâmetros densitométricos (densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo) da tíbia referente às ratas ovariectomizadas estatisticamente iguais às ratas intactas, indicando uma ação protetora contra o efeito osteopênico promovido pela ovariectomia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, R.A.; SOKOL, H.W. Studies of anterior pituitary-grafted rats: abnormal prolactin response to thyrotropin releasing hormone, clonidine, insulin and fasting. **Life Sciences**, 32:2949-2956, 1983.
- ADLER, R.A.; FARRELL, M.E.; DEISS, W.P.; KRIEG, R.J.; MacLEOD, R.M. Hypercalciuria in new rat model of hiperprolactinemia. **Metabolism**, 40:292-296, 1991.
- ADLER, R.A.; EVANI, R.; MANSOURI, A.; KRIEG, R. J. Jr. Relative effects of prolactin excess and estrogen deficiency on bone in rats. **Metabolism**, 47:425-428, 1998.
- AGUADO, L.I.; GINENEZ, A.R.; RODRIGUEZ, E.M. Plasma prolactin levels in female rats bearing pars distalis or total pituitary gland grafts under the kidney capsule. **J Endocrinol**, 72:399-400, 1977.
- AGUADO, L.I.; ALVIAL, G.S.; RODRIGUEZ, E.M. Ultrastructure and immuno-cytochemistry of the pars distalis of the female rat when grafted under the kidney capsule and a parallel study of the plasma levels of prolactin. **J Endocrinol**, 89:157-166, 1981.
- AKHTER, M.P.; IWANIEC, U.T.; COVEY, M.A.; CULLEN, D.M.; KIMMEL, D.B.; RECKER, R.R. Genetic variations in bone density, histomorphometry, and strength in mice. **Calcif Tissue Int**, 67:337-344, 2000.
- AMAR, A.P.; WEISS, M.H. Pituitary anatomy and physiology. **Neurosurg Clin N Am**, 14(1):11-23, 2003.
- ARBOGAST, L.A.; VOOGT, J.L. Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. **Endocrinology**, 128(2):997-1005, 1991.
- ARMITAGE, M.; NOONEY, J.; EVANS, S. Recent concerns surrounding HRT. **Clin Endocrinol**, 59(2):145-55, 2003.
- BARENGOLTS, E.I.; GAJARDO, H.F.; ROSOL, T.J.; D'ANZA, J.J.; PENA, M.; BOTSIS, J.; KUKKEJA, S.C. Effects of progesterone on postovariectomy bone loss in aged rats. **J Bone Miner Res**, 5(11):1143-1147, 1990.
- BERN, H.A.; NICOLL, C.A. The comparative endocrinology of prolactin. **Rec Prog Horm Res**, 24:681-720, 1968.
- BERN, H.A. Prolactin and osmoregulation. **Am Zool**, 15: 937-949, 1975.
- BILLER, B.M.K.; BAMB, H.B.A.; ROSENTHAL, D.I.; SAXE, V.C.; CHARPIE, P.M. KLIBANSKI, A. Progressive trabecular osteopenia in women with hyperprolactinemic amenorrhea. **J Clin Endocrinol Metab**, 75: 692-697, 1992.
- BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERCY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocrine Reviews**, 19(3):225-268, 1998.
- BRANDI, M.L. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. **Am J Med**, 95(5A):69-745, 1993.
- BRAVO, G.; GAUTHIER, P.; ROY, P.M.; PAYETTE, H.; GAULIN, P.; HARVEY, M.; PÉLOQUIM, L. Impact of a 12- month exercise program on the physical and psychological health of osteopenic women. **Jags**, 44:756-762, 1996.

BRIDGES, R.S.; RONSHEIM, P.M. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. **Endocrinology**, 126:837-848, 1990.

BRONDINO, L. **Influência de ciclos reprodutivos subseqüentes sobre o tecido ósseo de ratas**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2002.

CARACENI, M.P.; CORGHI, E.; ORTOLANI, S.; CASAZZA, S. D'ALBERTON, A.; MOTTA, T. Increased forearm bone mineral content after bromocriptine treatment in hiperprolactinemia. **Calcif Tissue Int**, 37:687-9, 1985.

CARÓN, R.W.; SALICIONI, A.M.; DEIS, R.P. Regulation of prolactin secretion by adrenal steroids in oestrogen-treated ovariectomized rats: participation of endogenous opioid peptides. **Neuropharmacology**, 36(10):1433-1438, 1997.

CHEN, C.L.; AMENOMORI, Y.; LU, K.H.; VOOGT, J.L.; MEITES, J. Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. **Neuroendocrinology**, 6:220-227, 1970.

CLAPP, C.; De la ESCALERA, G.M. Prolactins: novel regulators of angiogenesis. **News Physiol Sci**, 12: 231-237, 1997.

CLEMENT-LACROIX, P.; ORMANDY, C.; LEPESCHEUX, L.; AMMANN, P.; DAMOTTE, D.; GOFFIN, V.; BOUCHARD, B.; AMLING, M.; GALLARD-KELLY, M.; BINART, N.; BARON, R.; KELLY, P.A. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knock-out mice. **Endocrinology**, 140:96-150, 1999.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, **Am J Med**, 1993.

COSS, D.; YANG, L.; KUO, C.B.; XU, X.; LUBEN, R.A.; WALKER, A.M. Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 279 (6): 1216-1225, 2000.

CROSS, N.A.; HILLMAN, L.A.S.; KRAUSE, G.F. Change in bone mineral density and markers of bone remodeling during lactation and post weaning in woman consuming high amounts of calcium. **J Bone Miner Res**, 10:1312-1320, 1995.

DANIELSEN, C.C., MOSEKILDE, L., ANDREASSEN, T.T. Long-Term Effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. **Calcif Tissue Int**, 50: 169-174, 1992.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. **Calcif Tissue Int**, 52:26-33, 1992.

DANIELSEN, C.C.; FLYVBJERG, A. Insulin-like growth factor I as a predictor of cortical bone mass in a long-term study of ovariectomized and estrogen-treated rats. **Bone**, 19(5):493-498, 1996.

DANOWSKI, J.S. Osteoporose conceito, classificação e clínica. **ARS CVRANDI Clínica Médica**, 29: 21-27, 1996.

De ROSA, M.; COLAO, A.; DI SARNO, A.; FERONE, D.; LANDI, M.L.; ZARRILLI, S.; PAESANO, L.; MEROLA, B.; LOMBARDI, G. Cabergolite treatment rapidly improves gonadal function in hiperprolactinemic males: a comparison with bromocriptine. **Eur J Endocrinol**, 138:286-293, 1998.

DeGROOT, L.J. **Endocrinology**. 3ª edição. WB Saunders Company, 1995, 878p.

- DEVOGELAER, J.P.; DEUXCHAISNES, C.N. Osteoporosis. **Br J Rheumatol**, 32 (4): 48-55, 1993.
- DICKSON, R.A.; GLAZER, W.M. Neuroleptic-induced hiperprolactinemia. **Schizophr Res**, 35:S75-S86, 1999.
- DOPPLER, W. Regulation of gene expression by prolactin. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 124:93-130, 1994.
- DRAGO, F.; CONTINELLA, G. Somatic growth in hypophysectomized pituitary-homografted rats is promoted by prolactin. **Experientia**, 41: 1442-1444, 1985.
- DUAN, W.R.; LINZER, D.I.H.; GIBORI, G. Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of prolactin receptor. **J Biol Chem**, 271(26):15602-15607, 1996.
- DUVILANSKI, B.H.; ZAMBRUNO, C.; SEILICOVICH, A.; PISERA, D.; LASAGA, M.; DIAZ, M. Del C.; BELOVA, N.; RETTORI, V.; McCANN, S.M. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. **Physiology**, 92: 170-174, 1995.
- EILER, K.K.; SCHAEFER, M.R.; SALSTRAM, D.; LOWERY, R. Double-blind comparison of bromocriptine and placebo in cocaine withdrawal. **Am J Drug and Alcohol abuse**, 21:65-79, 1995.
- EINHORN, T.A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**, San Diego: Academic Press, p 3-21, 1996.
- EISMAN, J.A. Genetics of osteoporosis. **Endocr Rev**, 20(6):788-804, 1999.
- ENGESAETER, L.B., EKELAND, A., LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop Scand**, 49: 512-18, 1978.
- FELDMAN, D.; MALLOY, P.J.; GROSS, C. Vitamin D: Metabolism and action. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**, San Diego: Academic Press, p 205-225, 1996.
- FERIOLI, M.E.; PIRONA, L.; PINOTTI, O. Prolactin and polyamine catabolism: specific effect on polyamine oxidase in rat thymus. **Mol Cell Endocrinol**, 165:51-56, 2000.
- FREEMAN, M.E.; KANYICKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. **Physiol Rev**, 80(4): 1523-1631, 2000.
- FUJIMAKI, T.; KURABAYASHI, T.; OOTANI, T.; YAMAMOTO, Y.; YASUDA, M., TANAKA, K. A study on bone metabolism in woman with hiperprolactinemia. **Nipp Sanka Fuj Gak Zas**, 46: 423-428, 1994.
- GIAVARESI, G.; De TERLIZZI, F.; GNUDI, S.; CARDOSSI, R.; NICOLI ALDINI, N.; FINI, M.; ROCCA, M.; RIPAMONTI, C.; BRANDI, M.L.; GIARDINO, R. Discriminant capacity of quantitative ultrasound versus dual x-ray absorptiometry to determine cancellous bone loss in ovariectomized rats. **Bone**, 26(3): 297-303, 2000.
- GOLD, D.T. The clinical impact of vertebral fractures: quality of life in women with osteoporosis. **Bone**, 18: S185-S189, 1996.
- GONZALEZ, M.D.; LÓPEZ, F.; AGUILAR, E. Involvement of prolactin in the onset of puberty in female rats. **J Endocr**, 101:63-68, 1983.
- GREENSPAN, S.L.; NEER, R.M.; RIDGWAY, E.C.; KLIBANSKI, A. Osteoporosis in men with hyperprolactinemic hypogonadism. **Ann Intern Med**, 104:777-782, 1986.

GUNIN, A.G. The role of prolactin in realization of estradiol action in the uterus of ovariectomized rats. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 64: 119-127, 1996.

HARRIS, G.W.; JACOBSON, D. Functional grafts of anterior pituitary gland. **Proc Roy Soc Lond (Biol)**, 139:262-276, 1952.

HIETALA, E.L. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. **Bone Miner**, 20:57-65, 1993.

HINUMA, Y.S.; HABATA, Y.; FUJI, R.; HOSOYA, M.; FUKUSUMI, S.; KITADA, C.; MASUO, Y.; ASANO, T.; MATSUMOTO, H.; SEKIGUCHI, M.; KUROKAWA, T.; NISHIMURA, O.; ONDA, H.; FUJINO, A. A prolactin-releasing peptide in the brain. **Nature**, 393:272-276, 1998.

HODGKINSON, A. Effects of calcium deprivation and orchidectomy on bone composition in the rat. **Horm Metab Res**, 11: 516-519, 1979.

HONDA, A.; KURABAYASHI, T.; YAHATA, T.; TOMITA, M.; TAKAKUWA, K.; TANAKA, K. Lumbar bone mineral density changes during pregnancy and lactation. **Int J Gynecol Obstet**, 63: 253-258, 1998.

HORROBIN, D.F.; BURSTYN, P.G.; LLOYD, I.J.; DURKIN, N.; LIPTON, A.; MUIRUKI, K.L. Actions of prolactin on human renal functions. **Lancet**, 2:352-354, 1971.

HU, Z.Z.; ZHUANG, L.; DUFAU, M.L. Prolactin receptor gene diversity: structure and regulation. **TEM**, 9(3):94-102, 1998.

IBATA, Y.; IJIMA, N.; KATAOKA, Y.; KAKIHARA, K.; TANAKA, M.; HOSOYA, M.; HINUMA, S. Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain. **Neurosci Res**, 38(3):223-230, 2000.

IKEDA, S.; TSURUKAMI, H.; ITO, M.; SAKAI, A.; SAKATA, T.; NISHIDA, S.; TAKEDA, S.; SHIRAIISHI, A.; NAKAMURA, T. Effects of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. **Bone**, 28(6):625-633, 2001.

INOUE, K.; KIRIIE, N.; KURIOKA, M.; FUJISAKI, Y.; IWASAKI, S.; YAMAGAMI, S. Bromocriptine enhances feeding behavior without changing dopamine metabolism. **Pharmac Biochem Behav**, 58(1):183-188, 1997.

JOHNELL, O. Advances in osteoporosis: better identification of risk factors can reduce morbidity and mortality. **J Int Med**, 239:299-304, 1996.

KASSTAD, T.S.; REIKERAS, O.; HALVORSEN, V.; FALCH, J.A.; OBRANT, K.J.; NORDSLETTEN, L. Vitamin D deficiency and ovariectomy reduced the strength of the femoral neck in rats. **Calcif Tissue Int**, 69: 102-108, 2001.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, 15: 171-192, 1991.

KANIS, J.A. The incidence of hip fractures in Europe. **Osteoporosis Int.**, 3(1): S10-S15, 1993.

KANIS, J.A. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. **Bone**, 19(5):185S-190S, 1998.

KANNUS, P.; NIEMI, S.; PARKKARI, J.; PALVAREN, M.; VUOR, J.; JYARVINEN, M. Hip fracture in Finland between 1970 and 1997 and predictions for the future. **Lancet**, 6:353, 1999.

KANYICKA, B.; LERANT, A.; FREEMAN, M.E. Endothelin is an autocrine regulator of prolactin secretion. **Endocrinology**, 139(12): 5164-5173, 1998.

- KATSUMATA, T.; NAKAMURA, T.; OHNISHI, H.; SAKURAMA, T. Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, 10(6):921-931, 1995.
- KAUFMAN, S.; MACKAY, B.J. Plasma prolactin levels and body fluid deficits in the rat: causal interactions and control of water intake. **J Physiol**, 336(1): 73-81, 1983.
- KELLER, T.S.; SPENGLER, D.M. Regulation of bone stress and strain in the immature and mature rat femur. **J Biomech**, 22:1115-1127, 1989.
- KLIBANSKI, A.; NEER, R.M.; BEITINS, I.Z. Decreased bone density in hyperprolactinemic women. **N Engl J Med** 303, 1511-1514, 1980.
- KLIBANSKI, A.; GREENSPAN, S.L. Increase in bone mass after treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. **N Engl J Med**, 315:542-6, 1986.
- KOLOSZAR, S.; GELLEN, J.; KOVACS, L. The value of plasma prolactin level determination in the diagnosis of postmenopausal osteoporosis. **Orv Hetil**, 138:71-73, 1997.
- KUO, C.B.; COSS, D.; WALKER, A.M. Prolactin receptor antagonists. **Endocrinology**, 9:121-131, 1998.
- KUZMINA, T.I.; LEBEDEVA, I.Y.; TORNER, H.; ALM, H.; DENISENKO, V.Y. Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, 51:1363-1374, 1999.
- LAMBERTS, S.W.J.; MacLEOD, R.M. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. **Physiol Rev**, 70:279-318, 1990.
- LEPOLA, V.T.; HANNUNIEMI, R.; KIPPO, K.; LAURÉN, L.; JALOVAARA, P.; VÄÄNÄNEN, H.K. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. **Bone**, 18(2):191-196, 1996.
- LINDSAY, R. The menopause and osteoporosis. **Obstet Gynecol**, 87(2):16S-19S, 1996.
- LOPEZ, J.M.; GONZALEZ, G.; REYES, V.; CAMPINO, C.; DIAZ, S. Bone turnover and density in healthy women during breastfeeding and after weaning. **Osteoporosis Int**, 6:153-159, 1997.
- LOTINUN, S.; LIMLOMWONGSE, L.; KRISHNAMRA, N. The study of a physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, 76:218-228, 1998.
- LOTINUM, S.; LIMLOMWONGSE, L.; SIRIKULCHAYANONTA, V.; KRISHNAMRA, N. Bone calcium turnover, formation, and resorption in bromocriptine and prolactin-treated lactating rats. **Endocrine**, 20(1-2):163-170, 2003.
- MALMROS, B.; MORTENSEN, L.; JENSEN, M.B.; CHARLES, P. Positive effects of physiotherapy on chronic pain and performance in osteoporosis. **Osteoporosis Int**, 8: 215-221, 1998.
- MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, 21(2):115-137, 2000.
- MARQUES NETO, J.F. **Campanha nacional de prevenção da osteoporose**. 1ª edição. São Paulo, Merck Sharp & Dohme, 2001, 54p.
- MARTIN, R.B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **J Biomech**, 23(10):1021-1029, 1990.

MATSUYAMA, J.; ESHIMA, N.; FUKUNAGA, T.; HORI, S.; KOBAYASHI, H.; ISONO, M. Various risks of osteoporosis in patients with pituitary adenomas. **J Bone Miner Metab**, 21:91-97, 2003.

MEANEY, A.M.; O'KEANE, V. Prolactin and schizophrenia: clinical consequences of hyperprolactinaemia. **Life Sci**, 71(9):979-992, 2002.

MELTON, L.J.; RIGGS, B.L. Epidemiology and cost of osteoporotic fractures. In: **International Conference on Osteoporosis**. Milano, 1986.

MELTON, L.J.; CHRISCHILLES, E.A.; COOPER, C.; LANE, A.W.; RIGGS, B.L. Perspective: how many women have osteoporosis? **J Bone Miner Res**, 7: 1005-1010, 1992.

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

MITCHELL, S.L.; GRANT, S.; AITCHISON, T. Physiological effects of exercise on post-menopausal osteoporotic women. **Physiotherapy**, 84 (4):157-163, 1998.

MOGG, R.J.; SAMSON, W.K. Interactions of dopaminergic and peptidergic factors in the control of prolactin release. **Endocrinology**, 126(2):728-735, 1989.

MONTEAGUDO, M.D.; HERNÁNDEZ, E.R.; SECO, C.; GONAZALES-RIOLA, J.; REVILLA, M.; VILLA, L.F.; RICO, H. Comparison of the robusticity index and bone weight/bone length index with the results of bone densitometry and bone histomorphometry in experimental studies. **Acta Anatomica**, 160: 195-199, 1997.

MONTERO, A; GIOVANNONI, A.D.; SEN, L. **Propiedades inmunológicas de la prolactina**. Medicina (Buenos Aires), 60:515-520, 2000.

MORIMOTO, I.; KAI, K.; OKADA, Y.; OKIMOTO, N.; URIU, K.; AKINO, K.; YAMASHITA, S.; NAKAMURA, T.; ETO, S. Skeletal changes in rats bearing mammosomatotrophic pituitary tumors: a model of acromegaly with gonadal dysfunction. **Bone**, 26(3): 255-261, 2000.

MUNDY, G.R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, 24(5S):35S-38S, 1999.

NASELLO, A.G.; VANZELER, M.L.A.; MADUREIRA, E.H.; FELICIO, L.F. Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. **Pharmac Biochem Behav**, 58 (4): 1089-1094, 1997.

NGUYEN, T.V.; KELLY, P.J.; SAMBROOK, P.N.; GILEBRT, C.; POCOCK, N.A.; EISMAN, J.A. Lifestyle factors and bone density in the elderly: implications for osteoporosis prevention. **J Bone Miner Res**, 9(9):1339-1346, 1994.

NISWENDER, G.D; CHEN, C.L.; MIDGLEY Jr.; A.R.; MEITES, J.; ELLIS, S. Radioimmunoassay for rat prolactin. **Proc Soc Exp Biol Med**, 130:793-797, 1969.

NORDSLETTEN, L.; KAASTAD, T.S.; MADSEN, J.E.; REIKERAS, O.; OVSTEBO, R.; STROMME, J.H.; FALCH, J. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcif Tissue Int**, 55:436-442, 1994.

PARFITT, A.M.; CHIR, B. Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. **Clin Obstret Gynecol**, 30(4):789-811, 1987.

PAZ, L.H.B.C.; FALCO, V. de; TENG, N.C.; REIS, L.M. dos; PEREIRA, R.M.R.; JORGETTI, V. Effects of 17 β estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. **Braz J Med Biol Res**, 34:1015-1022, 2001.

PENG, Z.; TUUKKANEN, H.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H.K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, 15 (5): 523-532, 1994.

PÉREZ-VILLAMIL, B.; BORDIU, E.; PUENTE-CUEVA, M. Involvement of physiological prolactin levels in growth and prolactin receptor content of prostate glands and testes in developing male rats. **J Endocrinol**, 132:449-459, 1992.

PICARD, D.; IMBACH, A.; COUTURIER, M.; LEPAGE, R., STE-MARIE, L.G. Longitudinal study of bone density and its determinants in women in pre or early menopause. **Calcif Tissue Int**, 67:356-360, 2000.

PIYABHAN, P.; KRISHNAMRA, N.; LIMLOMWONGSE, L. Changes in the regulation of calcium metabolism and bone calcium content during growth in the absence of endogenous prolactin and during hyperprolactinemia: a longitudinal study in male and female Wistar rats. **Can J Physiol Pharmacol**, 78: 757-765, 2000.

POLATTI, F.; CAPUZZO, E., VIAZZO, F.; COLLEONI, R.; KLERSY, C. Bone mineral changes during and after lactation. **Obstet Gynecol**, 94(1): 52-56, 1999.

PLAPLER, P.G. Osteoporose e Exercícios. **Rev Hosp Clin Fac Med**, 52 (3):163-170, 1997.

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

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. The prevention and treatment of osteoporosis. **N England J Med**, 327:620-7, 1992.

ROZHINSKAIA, L.I.; MAROVA, E.I.; DZERANOVA, L.K.; RASSOKHIN, B.M.; PURTOVA, G.S.; GONCHAROV, N.P.; MISHCHENKO, B.P.; ILOVAISKAIA, I.A. Bone tissue in patients with hyperprolactinemic hypogonadism. **Probl Endokrinol Mosk**, 38(6):17-19, 1992.

RYNIKOVA, A.; KOPPEL, J.; KUCHAR, S.; CIKOS, S.; MOZES, S. Effects of ovine prolactin in infant rats. **Exp Clin Endocrinol**, 92:241-244, 1988.

SØGAARD, L.H., MOSEKILDE, LI., THOMSEN, J.S., RICHARDS, A., McOSKER, J.E. Comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in a osteopenic rat model. **Bone**, 20: 439-49, 1997.

SARTORI, L.; MAGGI, S. Epidemiology of osteoporotic fractures. **Ann Ital Med Int**, 10: 5-8, 1995.

SCHLECHTE, J.A.; SHERMAN, B.; MARTIN, R. Bone density in amenorrheic women with and without hyperprolactinemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 56(6): 1120-1123, 1983.

SCHLECHTE, J.; WALKNER, L.; KATHOL, M. A longitudinal analyses of premenopausal bone loss in healthy women and women with hyperprolactinemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 75: 698-703, 1992.

SCHLECHTE, J. Clinical impact of hyperprolactinaemia. **Bailliere Clin Endocrinol Metab**, 9: 359-366, 1995.

SHAARAWY, M.; EL-DAWAKHLY, A.S.; MOSAAD, M.; EL-SADEK, M.M. Biomarkers of bone turnover and bone mineral density in hyperprolactinemic amenorrheic women. **Clin Chem Lab Med**, 37(4):433-438, 1999.

SILVERIN, B. Effects of prolactin on the gonad and body weight of the male pied flycatcher during the breeding period. **Endokrinologie**, 76:45-50, 1980.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G.W. **Statistical Methods**, 7ª edição, Iowa State University Press, Ames, 1980, 332p.

DI SOMMA, C.; COLAO, A.; DI SARNO, A.; KLAIN, M.; LANDI, M.L.; FACCIOLLI, G.; PIVONELLO, R.; PANZA, N.; SALVATORE, M.; LOMBARDI, G. Bone marker and bone density responses to dopamine agonist therapy in hyperprolactinemic males. **J Clin Endocrinol Metab**, 83(3): 807-813, 1998.

SOWERS, M.F.; HOLLIS, B.W.; SHAPIRO, B.; RANDOLPH, J.; JANNEY, C.A.; ZHANG, D.; SCHORK, A.; CRUTCHFIELD, M.; STANCZYK, F.; RUSSEL-AULET, M. Elevated parathyroid hormone related peptide associated with lactation and bone density loss. **JAMA**, 276:549-554, 1996.

STRUMAN, I.; BENTZIEN, F.; LEE, H.Y.; MAINFROID, V.; D'ANGELO, G.; GOFFIN, V.; WEINER, R.I.; MARTIAL, J.A. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. **Proc Natl Acad USA**, 96: 1246-1251, 1999.

TEITELBAUM, S.L., TONDRAVI, M.M., ROSS, F.P. Osteoclast Biology. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**, San Diego: Academic Press, p.61-94, 1996.

THOMPSON, D.D. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, 17(4):125-33, 1995.

THORNER, M.O.; FLUCKIGER, E.; CALNE, D.B. **Bromocriptine**: a clinical and pharmacological review. Nova York: Raven Press, 1980, 210p.

TOJO, Y.; KURABAYASHI, T.; HONDA, A.; YAMAMOTO, Y.; YAHATA, T.; TAKAKUWA, K.; TANAKA, K. Bone structural and metabolic changes at the end of pregnancy and lactation in rats. **Am J Obstet Gynecol**, 178:180-185, 1998.

TORRING, O.; ISBERG, B.; SJOBERG, H.E.; BUCHT, E.; HULTING, A.L. Plasma calcitonin, IGF-I levels and vertebral bone mineral density in hyperprolactinemic women during bromocriptina treatment. **Acta Endocrinol**, 128(5):423-427, 1993.

TUCKER, H.A. Lactation and its hormonal control. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. Nova York: Raven, 1994, 1298p.

TUUKKANEN, J., PENG, Z., VÄÄNÄNEN, H.K. Effect of running exercise on the bone loss induced by orchidectomy in the rat, **Calcified Tissue Int**, 55:33-37, 1994.

VÄÄNÄNEN, H.K. Pathogenesis of osteoporosis. **Calcified Tissue Int**, 49:S11-S14, 1991.

VÄÄNÄNEN, H.K.; HÄRKÖNEN, P.L. Estrogen and bone metabolism. **J climat postmenop**, 23:S65-S69, 1996.

VALENTE, D.; DELAFORGE, M.; URIEN, S.; GUIVARC'H, D.; VIENET, R.; GROGNET, J.M.; EZAN, E. Metabolite involvement in bromocriptine-induced prolactin inhibition in rats. **J Pharmac Exp Therap**, 282(3):1418-1424, 1997.

VANDERSCHUEREN, D.; HERCK, E.V.; SUIKER, A.M.H.; VISSER, W.J.; SCHOT, L.P.C.; BOUILLON, R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. **Endocrinology**, 130: 2906-2916, 1992.

VEKMANS, M.; ROBYN, C. Influence of age on serum prolactin levels in women and men. **Br Med J**, 4:738-739, 1975.

VILLANUEVA, L.A.; LARA, E.G. La prolactina y su participación en la regulación de la función ovárica. **Ginec Obst Mex**, 66:512-516, 1998.

WARD, J.A. Physiologic, health and lifestyle factors associated with femoral neck bone density in older women. **Bone**, 4: 373 S-378 S, 1995.

WEIGENT, D.A. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. **Pharmacol Ther**, 69(3):237-257, 1996.

WESTERLIND, K.C.; WRONSKI, T.J.; RITMAN, E.L.; LUO, Z.P.; AN, K.N.; BELL, N.H.; TURNER, R.T. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. *Physiology*, 94:4199-4204, 1999.

WILLS, M.R. Osteoporosis diagnosis and therapeutic management. **Rev Soc Bras Densitom Clin**, 7(2):3-13,1998.

WIMALAWANSA, S.J. Prevention and treatment of osteoporosis: efficacy of combination of hormone replacement therapy with other antiresorptive agents. **J Clin Densitom**, 3(2):187-200, 2000.

WYNICK, D.; SMALL, C.J.; BACON, A.; HOLMES, F.E.; NORMAN, M.; ORMANDY, C.J.; KILIC, E.; KERR, N.C.H.; GHATEI, M.; TALAMANTES, F.; BLOOM, S.R.; PACHNIS, V. Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. **Neurobiology**, 95: 12671-12676, 1998.

YAZIGI, R.A.; QUINTERO, C.H.; SALAMEH, W.A. Prolactin disorders. **Fertility and Sterility**, 67(2):215-225, 1997.

YBARRA, J; ADE, R.; ROMEO, J.H. Osteoporosis in men: a review. **Nursing Clinics of North America**, 31(4): 805-12, 1996.

YEN, S.S.C.; JAFFE, R.R. **Reproductive endocrinology**: physiology, pathophysiology and clinical management. Ed WB Saunders Company, 1991, 402p.

YOU, T.; KOVAL, K.J.; ZUCKERMAN, J.D. The economic impact of geriatric hip fractures. **Am J Orthop**, 28(7):423-428, 1999.

YU-LEE, L.Y. Molecular actions of prolactin in the immune system. **Proc Soc Exp Biol Med**, 215(1):35-52, 1997.

ZARATE, A.; CANALES, E.S.; FORSBACH, G.; FERNANDEZ-LAZALA, R. Clinical experience in the induction of pregnancy in amenorrhea-galactorrhea syndrome. **Obstet Gynecol**, 52:442-444, 1978.

ZARROW, M.X.; YOCHIM, J.M.; McCARTHY, J.L. **Experimental Endocrinology**: a sourcebook of basic techniques. New York: Academic Press, 1964, 519p.

Apêndice

Parâmetros Biométricos - Grupo Basal

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
Basal		245,000		34,350	3,550	2,400
n=12		252,000		34,750	3,600	2,550
		250,000		34,750	3,500	2,500
		254,000		34,600	3,350	2,300
		250,000		35,350	3,550	2,700
		251,000		34,200	3,400	2,550
		257,000		34,750	3,250	2,500
		246,000		34,200	3,250	2,600
		246,000		34,750	3,450	2,550
		236,000		33,200	3,550	2,500
		245,000		34,150	3,300	2,700
		230,000		34,750	3,250	2,450
Média		246,833		34,483	3,417	2,525
DP		7,554		0,527	0,134	0,114
EPM		2,181		0,152	0,039	0,033

Parâmetros Biomecânicos - Grupo Basal

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	75,500	136,500	31,700
	87,100	151,700	47,100
	85,200	155,500	36,800
	71,000	139,600	33,000
	86,000	166,500	45,300
	83,000	150,200	35,700
	79,000	150,500	29,900
	86,200	163,800	39,100
	79,000	130,300	43,100
	90,900	165,500	44,600
	87,500	152,400	37,700
	74,400	134,000	30,900
	82,067	149,708	37,908
	6,174	12,342	5,987
	1,782	3,563	1,728

Parâmetros Biométricos - Grupo HiperPRL

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
Inta6m	261,000	292,000	31,000	36,550	3,450	2,500
n=9	238,000	261,000	23,000	36,200	3,750	2,750
	265,000	284,000	19,000	36,250	3,700	2,850
	238,000	253,000	15,000	35,900	3,250	2,600
	260,000	290,000	30,000	36,800	3,500	2,550
	261,000	281,000	20,000	36,350	3,300	2,550
	235,000	258,000	23,000	35,250	3,650	2,750
	240,000	256,000	16,000	35,600	3,400	2,450
	230,000	285,000	55,000	35,500	3,500	2,550
Média	247,556	273,333	25,778	36,044	3,500	2,617
DP	13,812	15,953	12,276	0,516	0,173	0,135
EPM	4,604	5,318	4,092	0,172	0,058	0,045

Parâmetros Biomecânicos - Grupo HiperPRL

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	88,600	163,300	28,300
	107,600	222,100	35,800
	98,400	192,000	44,900
	86,300	151,200	40,000
	99,400	188,300	44,700
	92,800	170,300	50,900
	98,400	189,100	52,800
	98,600	163,900	35,800
	94,600	172,800	37,500
Média	96,078	179,222	41,189
DP	6,378	21,143	7,862
EPM	2,126	7,048	2,621

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
OVX+sham	258,000	283,000	25,000	36,500	3,900	2,400
n=11	230,000	264,000	34,000	35,100	3,700	2,450
	237,000	290,000	53,000	35,600	3,650	2,450
	246,000	310,000	64,000	35,300	3,650	2,350
	249,000	317,000	68,000	36,150	3,650	2,650
	251,000	306,000	55,000	36,450	3,750	2,600
	222,000	272,000	50,000	36,700	3,700	2,600
	260,000	335,000	75,000	38,150	3,950	2,700
	250,000	323,000	73,000	36,750	4,250	2,850
	267,000	317,000	50,000	38,100	3,800	2,600
	249,000	280,000	31,000	34,750	4,000	2,500
Média	247,182	299,727	52,545	36,323	3,818	2,559
DP	13,182	23,100	16,967	1,115	0,190	0,146
EPM	3,975	6,965	5,116	0,336	0,057	0,044

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	87,000	163,400	28,200
	88,300	159,200	35,400
	90,400	174,600	46,600
	89,200	161,400	32,700
	72,600	171,800	32,300
	84,200	153,300	31,000
	81,800	143,500	36,200
	90,100	156,000	49,900
	94,500	168,400	46,900
	74,300	165,500	20,300
	88,700	168,400	41,500
Média	85,555	162,318	36,455
DP	6,837	9,011	8,998
EPM	2,061	2,717	2,713

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
OVX+hip	257,000	301,000	44,000	36,600	3,900	2,700
n=13	261,000	300,000	39,000	35,800	3,700	2,800
	261,000	292,000	31,000	35,650	3,800	2,850
	255,000	304,000	49,000	36,100	3,500	2,650
	251,000	320,000	69,000	35,700	3,900	2,900
	225,000	260,000	35,000	33,000	3,600	2,600
	245,000	327,000	82,000	33,800	4,100	2,300
	253,000	311,000	58,000	36,450	3,750	2,600
	239,000	294,000	55,000	37,750	3,550	2,700
	241,000	279,000	38,000	36,400	3,850	2,700
	239,000	315,000	76,000	36,300	3,700	2,600
	251,000	312,000	61,000	36,850	3,500	2,650
	265,000	332,000	67,000	36,150	3,450	2,500
Média	249,462	303,615	54,154	35,888	3,715	2,658
DP	11,259	19,645	16,390	1,244	0,193	0,154
EPM	3,123	5,449	4,546	0,345	0,054	0,043

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	87,600	153,100	29,000
	94,500	161,400	40,700
	53,400	156,800	11,000
	90,300	160,900	42,600
	90,700	139,300	40,000
	88,500	121,300	52,600
	84,000	140,900	32,500
	91,800	171,300	50,000
	88,200	177,300	37,100
	95,000	172,000	49,000
	96,600	178,400	49,700
	91,500	193,400	36,300
	93,200	155,500	42,500
Média	88,100	160,123	39,462
DP	10,973	19,141	11,120
EPM	3,043	5,309	3,084

Parâmetros Biométricos - Grupo HipoPRL

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
inta+sal	246,000	302,000	56,000	36,350	3,850	2,600
n=10	235,000	272,000	37,000	36,000	3,250	2,300
	235,000	284,000	49,000	33,850	3,200	2,400
	240,000	306,000	66,000	36,000	3,200	2,300
	245,000	303,000	58,000	35,800	3,800	2,500
	255,000	340,000	85,000	34,550	3,150	2,250
	230,000	284,000	54,000	34,850	3,100	2,200
	245,000	303,000	58,000	35,500	3,500	2,400
	240,000	315,000	75,000	35,400	3,300	2,450
	246,000	341,000	95,000	36,600	3,750	2,650
Média	237,625	255,500	17,875	35,490	3,410	2,405
DP	8,733	12,340	6,999	0,855	0,290	0,148
EPM	2,762	3,902	2,213	0,270	0,092	0,047

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
OVX +sal	248,000	273,000	25,000	35,100	3,600	2,600
n=8	225,000	244,000	19,000	36,650	3,750	2,550
	225,000	243,000	18,000	36,750	4,100	2,800
	247,000	269,000	22,000	36,100	3,650	2,400
	236,000	247,000	11,000	37,300	3,600	2,650
	240,000	262,000	22,000	35,900	3,350	2,500
	240,000	262,000	22,000	36,600	3,500	2,600
	240,000	244,000	4,000	36,700	3,750	2,650
Média	241,700	305,000	63,300	36,388	3,663	2,594
DP	7,212	22,632	17,359	0,671	0,220	0,118
EPM	2,550	8,002	6,137	0,237	0,078	0,042

	PC Inicial (g)	PC Final (g)	Var do PC (g)	L fêmur (mm)	D maior (mm)	D menor (mm)
OVX+bct	246,000	320,000	74,000	36,800	3,900	2,400
n=9	266,000	308,000	42,000	36,950	4,000	2,750
	255,000	313,000	58,000	36,750	3,700	2,750
	243,000	325,000	82,000	36,900	3,800	2,700
	257,000	333,000	76,000	36,800	3,850	2,750
	260,000	298,000	38,000	36,150	3,750	2,550
	252,000	344,000	92,000	37,100	3,750	2,650
	245,000	313,000	68,000	35,600	3,700	2,700
	234,000	315,000	81,000	36,800	3,650	2,850
Média	250,889	318,778	67,889	36,650	3,789	2,678
DP	9,829	13,728	18,429	0,472	0,111	0,133
EPM	3,276	4,576	6,143	0,157	0,037	0,044

Parâmetros Biomecânicos - Grupo HipoPRL

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	106,000	202,700	39,800
	92,200	167,100	51,400
	103,000	179,200	47,900
	94,500	185,800	29,800
	86,200	137,500	36,300
	96,000	179,600	33,200
	90,000	166,900	33,500
	93,900	167,600	32,700
	98,300	213,800	46,000
	106,400	193,600	45,200
Média	96,650	179,380	39,580
DP	6,761	21,529	7,551
EPM	2,138	6,808	2,388

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	73,200	135,600	25,300
	74,300	139,200	26,200
	74,400	143,700	23,500
	90,200	153,700	35,800
	75,300	85,360	45,600
	65,200	91,860	33,600
	80,900	150,900	36,600
	87,700	154,300	41,200
Média	77,650	131,828	33,475
DP	8,204	27,551	7,938
EPM	2,901	9,741	2,807

	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Cap Abs Energia (mJ)
	82,400	149,000	33,400
	104,500	208,300	47,000
	104,700	215,000	44,300
	87,600	174,800	26,700
	94,900	180,100	40,600
	89,400	199,000	24,400
	98,900	180,400	47,400
	100,400	184,300	40,800
	112,800	209,100	46,800
Média	97,289	188,889	39,044
DP	9,639	21,004	8,839
EPM	3,213	7,001	2,946

Parâmetros Físicos - Grupo Basal

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm ³)	Dens óssea (g/cm ³)	Dens Min (g/cm ³)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
Basal	0,329	0,764	0,427	0,301	0,435	1,758	0,692	44,065	16,569	39,367
n=12	0,342	0,746	0,449	0,311	0,404	1,848	0,771	39,820	18,442	41,738
	0,339	0,785	0,455	0,313	0,446	1,761	0,701	42,104	18,072	39,824
	0,320	0,666	0,418	0,294	0,346	1,925	0,849	37,205	18,678	44,117
	0,358	0,813	0,477	0,331	0,455	1,788	0,727	41,350	17,964	40,686
	0,342	0,775	0,451	0,315	0,433	1,789	0,727	41,858	17,510	40,632
	0,322	0,740	0,436	0,301	0,418	1,772	0,720	41,106	18,235	40,660
	0,318	0,707	0,419	0,289	0,389	1,817	0,742	40,733	18,449	40,818
	0,337	0,774	0,448	0,309	0,437	1,771	0,707	42,188	17,885	39,928
	0,324	0,707	0,429	0,297	0,383	1,846	0,776	39,287	18,696	42,017
	0,321	0,693	0,419	0,292	0,373	1,860	0,783	39,541	18,350	42,109
	0,329	0,763	0,432	0,298	0,434	1,758	0,686	43,381	17,602	39,017
Média	0,332	0,744	0,438	0,304	0,413	1,808	0,740	41,053	18,037	40,909
DP	0,012	0,043	0,018	0,012	0,034	0,052	0,047	1,894	0,601	1,412
EPM	0,004	0,013	0,005	0,003	0,010	0,015	0,014	0,547	0,173	0,408

Parâmetros Físicos - Grupo HiperPRL

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm ³)	Dens óssea (g/cm ³)	Dens Min (g/cm ³)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
Inta6m	0,377	0,823	0,518	0,360	0,446	1,845	0,807	37,049	19,242	43,710

n=9	0,381	0,856	0,513	0,358	0,475	1,803	0,754	40,061	18,103	41,836
	0,391	0,819	0,529	0,371	0,427	1,916	0,868	35,321	19,340	45,339
	0,345	0,749	0,468	0,315	0,404	1,854	0,779	40,192	17,814	41,994
	0,381	0,884	0,526	0,363	0,503	1,759	0,722	40,527	18,437	41,036
	0,369	0,847	0,510	0,353	0,478	1,773	0,740	39,792	18,491	41,717
	0,328	0,798	0,463	0,342	0,470	1,697	0,688	41,937	17,517	40,546
	0,332	0,772	0,490	0,358	0,440	1,754	0,700	43,085	17,029	39,886
	0,353	0,850	0,504	0,346	0,497	1,709	0,696	40,727	18,557	40,715
Média	0,362	0,822	0,502	0,352	0,460	1,790	0,750	39,855	18,281	41,864
DP	0,023	0,043	0,024	0,016	0,033	0,071	0,059	2,360	0,757	1,702
EPM	0,008	0,014	0,008	0,005	0,011	0,024	0,020	0,787	0,252	0,567

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm3)	Dens óssea (g/cm3)	Dens Min (g/cm3)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
OVX+sham	0,365	0,781	0,484	0,344	0,416	1,877	0,825	38,078	17,957	43,965
n=11	0,359	0,739	0,472	0,339	0,381	1,943	0,891	36,215	17,925	45,860
	0,394	0,778	0,472	0,333	0,384	2,026	0,866	39,285	17,971	42,743
	0,349	0,764	0,462	0,324	0,415	1,841	0,781	39,490	18,063	42,448
	0,383	0,758	0,472	0,330	0,375	2,023	0,881	37,757	18,681	43,562
	0,351	0,855	0,476	0,331	0,503	1,698	0,658	44,325	16,897	38,778
	0,341	0,746	0,459	0,322	0,405	1,843	0,795	38,458	18,432	43,110
	0,373	0,853	0,492	0,349	0,480	1,778	0,748	39,941	17,982	42,076
	0,364	0,892	0,491	0,348	0,528	1,690	0,660	42,727	18,201	39,071
	0,355	0,833	0,478	0,338	0,478	1,742	0,707	42,579	16,847	40,574
	0,320	0,728	0,414	0,285	0,408	1,783	0,699	43,046	17,757	39,197
Média	0,359	0,793	0,470	0,331	0,434	1,840	0,774	40,173	17,883	41,944
DP	0,020	0,055	0,021	0,018	0,054	0,118	0,086	2,607	0,562	2,280
EPM	0,006	0,017	0,006	0,005	0,016	0,036	0,026	0,786	0,169	0,688

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm3)	Dens óssea (g/cm3)	Dens Min (g/cm3)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
OVX+hip	0,342	0,808	0,450	0,314	0,466	1,733	0,674	44,264	16,867	38,869
n=13	0,340	0,789	0,449	0,313	0,449	1,756	0,697	43,129	17,191	39,681
	0,264	0,734	0,438	0,306	0,470	1,562	0,652	40,240	17,993	41,767
	0,354	0,757	0,476	0,327	0,403	1,880	0,811	37,145	19,728	43,127
	0,345	0,809	0,459	0,317	0,463	1,746	0,685	43,297	17,462	39,241
	0,266	0,562	0,340	0,231	0,297	1,896	0,777	39,474	19,523	41,003
	0,351	0,795	0,464	0,323	0,444	1,792	0,729	41,669	17,644	40,687
	0,341	0,781	0,459	0,315	0,440	1,774	0,716	41,260	18,363	40,376
	0,343	0,840	0,454	0,314	0,497	1,691	0,632	45,964	16,655	37,381
	0,344	0,792	0,460	0,315	0,448	1,769	0,704	41,960	18,239	39,800
	0,352	0,789	0,473	0,326	0,437	1,805	0,747	40,086	18,534	41,379
	0,340	0,791	0,455	0,314	0,451	1,753	0,696	42,543	17,770	39,687
	0,348	0,818	0,462	0,316	0,470	1,741	0,673	43,589	17,761	38,651
Média	0,333	0,774	0,449	0,310	0,441	1,761	0,707	41,894	17,979	40,127
DP	0,031	0,069	0,034	0,025	0,049	0,082	0,050	2,307	0,915	1,500
EPM	0,009	0,019	0,009	0,007	0,013	0,023	0,014	0,640	0,254	0,416

Parâmetros Físicos - Grupo HipoPRL

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm3)	Dens óssea (g/cm3)	Dens Min (g/cm3)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
inta+sal	0,343	0,782	0,483	0,328	0,440	1,779	0,745	38,292	19,811	41,897

n=10	0,345	0,725	0,453	0,322	0,380	1,909	0,848	37,543	18,048	44,409
	0,351	0,802	0,490	0,335	0,450	1,780	0,743	38,902	19,326	41,772
	0,395	0,896	0,539	0,378	0,462	1,786	0,754	39,817	18,000	42,183
	0,352	0,774	0,466	0,324	0,423	1,832	0,767	39,742	18,411	41,848
	0,414	0,861	0,501	0,354	0,447	1,926	0,791	41,803	17,114	41,083
	0,325	0,732	0,427	0,293	0,407	1,799	0,721	41,686	18,240	40,074
	0,303	0,742	0,464	0,328	0,439	1,690	0,748	37,401	18,350	44,250
	0,322	0,817	0,483	0,338	0,495	1,649	0,683	40,837	17,738	41,425
	0,390	0,896	0,532	0,377	0,456	1,770	0,744	40,598	17,363	42,039
Média	0,354	0,803	0,484	0,338	0,440	1,792	0,754	39,662	18,240	42,098
DP	0,035	0,064	0,034	0,026	0,032	0,085	0,043	1,600	0,821	1,324
EPM	0,011	0,020	0,011	0,008	0,010	0,027	0,014	0,506	0,260	0,419

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm3)	Dens óssea (g/cm3)	Dens Min (g/cm3)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
OVX +sal n=8	0,334	0,734	0,433	0,307	0,400	1,836	0,767	40,970	17,255	41,775
	0,292	0,610	0,368	0,232	0,418	1,916	0,727	39,774	19,288	37,938
	0,337	0,739	0,449	0,316	0,402	1,837	0,786	39,258	17,923	42,818
	0,377	0,832	0,505	0,357	0,455	1,827	0,785	39,286	17,761	42,953
	0,308	0,666	0,392	0,274	0,358	1,862	0,766	41,199	17,663	41,138
	0,315	0,691	0,408	0,287	0,376	1,839	0,763	40,941	17,583	41,476
	0,314	0,732	0,454	0,319	0,417	1,754	0,764	37,890	18,535	43,576
	0,334	0,734	0,441	0,311	0,400	1,836	0,778	39,913	17,734	42,353
	Média	0,326	0,717	0,431	0,300	0,403	1,838	0,767	39,904	17,968
DP	0,025	0,064	0,042	0,037	0,029	0,045	0,019	1,119	0,645	1,743
EPM	0,009	0,023	0,015	0,013	0,010	0,016	0,007	0,396	0,228	0,616

	P. Imerso (g)	P úmido (g)	P seco (g)	P cinza (g)	Vol ósseo (cm3)	Dens óssea (g/cm3)	Dens Min (g/cm3)	% água	% Mat Orgânico	% Mat Mineral
OVX+bet n=9	0,369	0,804	0,492	0,342	0,434	1,850	0,788	38,731	18,656	42,614
	0,376	0,897	0,520	0,362	0,521	1,721	0,695	41,984	17,614	40,401
	0,359	0,809	0,486	0,342	0,449	1,799	0,762	39,913	17,749	42,338
	0,342	0,858	0,477	0,334	0,516	1,663	0,649	44,408	16,595	38,997
	0,362	0,832	0,506	0,358	0,470	1,770	0,761	39,200	17,840	42,960
	0,352	0,795	0,470	0,329	0,444	1,792	0,741	40,850	17,809	41,341
	0,379	0,817	0,515	0,365	0,438	1,864	0,832	37,009	18,358	44,633
	0,335	0,769	0,456	0,318	0,434	1,771	0,733	40,764	17,847	41,388
	0,354	0,810	0,484	0,340	0,456	1,775	0,745	40,222	17,827	41,951
Média	0,359	0,821	0,490	0,343	0,463	1,778	0,745	40,342	17,811	41,847
DP	0,015	0,037	0,021	0,016	0,034	0,061	0,052	2,088	0,563	1,602
EPM	0,005	0,012	0,007	0,005	0,011	0,020	0,017	0,696	0,188	0,534

Densitometria Óssea - Grupo Basal

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm ²)
Basal	0,090	0,237	2,634
n=12	0,097	0,276	2,858
	0,092	0,254	2,755
	0,093	0,242	2,607
	0,092	0,252	2,738
	0,093	0,250	2,701
	0,093	0,250	2,697
	0,088	0,234	2,649
	0,090	0,238	2,643
	0,090	0,244	2,710
	0,087	0,223	2,571
	0,088	0,229	2,607
Média	0,091	0,244	2,681
DP	0,003	0,014	0,079
EPM	0,001	0,004	0,023

Parâmetros Bioquímicos - Grupo Basal

Ativ Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
51,383	6,458	5,062	70,771	94,268
41,470	6,180	4,678	84,548	111,829
47,104	5,669	5,739	84,152	115,000
42,183	6,829	4,947	79,692	117,195
48,566	5,792	5,263	86,333	125,305
43,324	6,391	5,092	85,936	117,439
41,826	7,497	4,994	79,791	102,500
31,022	6,104	4,346	75,430	103,659
42,290	5,762	5,386	81,773	117,934
41,577	7,109	5,430	66,410	92,895
56,945	6,547	5,010	72,258	108,983
48,459	6,492	5,365	69,581	103,474
44,679	6,402	5,109	78,056	109,207
6,460	0,554	0,368	6,944	10,024
1,865	0,160	0,106	2,005	2,894

Densitometria Óssea - Grupo HiperPRL

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm2)
Inta6m	0,096	0,273	2,858
n=9	0,099	0,275	2,770
	0,098	0,278	2,837
	0,087	0,231	2,667

Parâmetros Bioquímicos - Grupo HiperPRL

Ativ Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
36,969	5,233	4,830	122,157	157,089
42,311	6,244	4,918	109,992	132,784
32,547	5,402	4,857	119,774	158,805
44,434	5,233	4,696	99,582	143,426

	0,094	0,258	2,751	30,282	4,437	4,891	102,717	128,390
	0,096	0,273	2,845	58,196	4,819	4,842	107,358	130,193
	0,089	0,233	2,615	43,741	5,994	4,772	107,386	123,427
	0,084	0,229	2,711	22,489	6,431	4,575	101,299	123,111
	0,096	0,278	2,903	34,883	5,596	4,254	113,961	128,865
Média	0,093	0,259	2,773	38,428	5,488	4,737	109,358	136,232
DP	0,005	0,022	0,096	10,246	0,654	0,210	7,956	13,677
EPM	0,002	0,007	0,032	3,415	0,218	0,070	2,652	4,559

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm2)	Atív Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
OVX+sham	0,091	0,252	2,768	45,698	5,096	4,541	105,438	125,830
n=11	0,091	0,236	2,584	53,286	6,286	4,499	107,265	115,839
	0,094	0,267	2,823	79,345	6,786	4,199	125,771	115,966
	0,090	0,259	2,860	38,454	7,519	4,531	112,622	123,427
	0,095	0,274	2,880	72,719	7,277	4,469	112,500	136,263
	0,090	0,260	2,885	47,037	6,295	4,280	113,961	127,347
	0,084	0,230	2,728	46,694	5,343	4,443	108,726	121,910
	0,084	0,245	2,924	67,225	6,839	4,356	107,873	126,360
	0,089	0,266	2,983	49,852	6,490	4,523	124,310	119,952
	0,083	0,240	2,881	80,169	7,189	4,631	106,047	115,901
	0,082	0,224	2,748	55,586	6,145	4,737	83,036	92,987
Média	0,089	0,250	2,824	57,824	6,479	4,474	109,777	120,162
DP	0,005	0,016	0,111	14,575	0,764	0,152	11,220	10,900
EPM	0,001	0,005	0,033	4,395	0,230	0,046	3,383	3,287

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm2)	Atív Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
OVX+hip	0,080	0,220	2,753	86,179	4,778	4,810	95,819	127,148
n=13	0,084	0,226	2,701	54,057	4,803	4,120	95,318	130,024
	0,081	0,219	2,692	68,880	5,676	4,340	96,823	112,907
	0,085	0,234	2,748	46,344	6,088	4,968	98,077	123,862
	0,083	0,231	2,796	94,351	5,073	4,713	97,952	135,022
	0,084	0,232	2,770	65,448	4,968	4,676	65,468	78,466
	0,082	0,230	2,804	67,642	5,760	4,489	97,324	124,136
	0,090	0,255	2,842	55,542	4,534	4,596	102,216	137,830
	0,091	0,259	2,850	61,203	5,659	4,426	98,955	129,900
	0,086	0,226	2,647	36,439	6,076	4,383	105,978	126,330
	0,092	0,264	2,870	44,257	6,080	4,637	102,843	134,844
	0,089	0,248	2,789	52,182	5,815	4,568	90,176	117,611
	0,089	0,246	2,749	49,104	6,240	4,786	102,216	131,068
Média	0,086	0,238	2,770	60,125	5,504	4,578	96,090	123,781
DP	0,004	0,015	0,065	16,477	0,591	0,227	10,039	15,284
EPM	0,001	0,004	0,018	4,570	0,164	0,063	2,784	4,239

Densitometria Óssea - Grupo HipoPRL

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm2)
inta+sal	0,092	0,271	2,949
n=10	0,087	0,245	2,797
	0,094	0,274	2,896
	0,099	0,296	2,984
	0,089	0,240	2,694

Parâmetros Bioquímicos - Grupo HipoPRL

	Atív Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
	43,054	6,694	5,053	113,352	129,625
	50,677	6,971	4,595	109,578	114,087
	70,978	6,878	4,416	108,442	108,646
	47,628	5,970	4,740	129,911	151,693
	44,316	6,256	4,860	112,256	115,115

	0,098	0,292	2,985	50,509	6,441	4,845	112,865	98,549
	0,092	0,261	2,825	48,555	5,474	5,017	90,950	91,838
	0,089	0,250	2,809	53,921	4,872	4,715	115,179	131,862
	0,093	0,265	2,843	67,732	5,921	4,804	116,883	140,458
	0,096	0,282	2,945	53,457	6,096	4,978	123,336	147,074
Média	0,093	0,267	2,873	53,082	6,157	4,802	113,275	122,895
DP	0,004	0,019	0,095	9,284	0,647	0,197	10,172	20,403
EPM	0,001	0,006	0,030	2,936	0,205	0,062	3,217	6,452

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm2)	Ativ Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
OVX +sal	0,089	0,238	2,682	44,481	6,835	4,711	103,734	122,201
n=8	0,089	0,225	2,523	38,718	5,878	4,804	90,828	95,611
	0,086	0,229	2,657	48,456	5,178	4,742	111,526	123,791
	0,096	0,267	2,777	29,676	6,660	4,641	113,109	137,087
	0,088	0,229	2,612	58,491	6,577	4,790	93,872	106,807
	0,089	0,236	2,665	41,798	4,707	4,455	99,594	113,232
	0,093	0,251	2,694	33,551	6,247	4,643	107,995	117,430
	0,086	0,221	2,572	32,491	5,304	4,713	106,534	128,499
Média	0,089	0,237	2,648	40,958	5,923	4,687	103,399	118,082
DP	0,004	0,015	0,078	9,529	0,786	0,111	8,059	12,958
EPM	0,001	0,005	0,028	3,369	0,278	0,039	2,849	4,581

	BMD (g/cm2)	BMC (g)	AREA (cm2)	Ativ Fosf Alcalina (U/I)	P sérico (mg/dl)	Ca sérico (mg/dl)	P ósseo (mg)	Ca ósseo (mg)
OVX+bet	0,098	0,282	2,897	64,751	7,184	4,671	105,317	125,191
n=9	0,095	0,279	2,944	68,461	6,188	4,631	122,971	140,585
	0,094	0,273	2,916	42,759	4,726	4,521	93,872	133,969
	0,090	0,261	2,902	44,287	6,290	4,535	100,933	114,573
	0,095	0,278	2,917	68,071	6,218	4,537	112,378	134,756
	0,098	0,284	2,891	46,676	6,150	4,740	72,952	101,768
	0,098	0,283	2,883	53,487	5,969	4,977	97,137	127,195
	0,091	0,247	2,722	43,645	5,412	5,026	88,216	119,695
	0,091	0,257	2,808	101,803	6,007	4,810	87,621	121,159
Média	0,094	0,271	2,876	59,326	6,016	4,716	97,933	124,321
DP	0,003	0,013	0,069	19,152	0,667	0,189	14,752	11,782
EPM	0,001	0,004	0,023	6,384	0,222	0,063	4,917	3,927

Variação do peso corporal - Grupo HiperPRL

	PC Inicial (g)	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana	5a semana	6a semana	7a semana	8a semana
Inta6m	261	268	279	271	284	290	295	290	292
n=9	238	241	260	250	248	250	255	258	261
	265	270	275	278	280	270	279	278	284
	238	237	243	245	247	250	255	249	253
	260	268	270	278	280	285	280	285	290
	261	270	280	278	280	284	275	270	281
	235	239	245	245	249	250	255	250	258
	240	236	240	241	247	240	250	253	256
	230	238	243	282	282	280	280	288	285
Média	247,6	251,9	259,4	263,1	266,3	266,6	269,3	269,0	273,3
DP	13,8	16,3	16,9	17,3	17,7	19,1	15,8	16,9	16,0
EPM	4,6	5,4	5,6	5,8	5,9	6,4	5,3	5,6	5,3

	PC Inicial (g)	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana	5a semana	6a semana	7a semana	8a semana
OVX+sham n=11	258	265	282	288	288	280	280	275	283
	230	235	240	250	256	253	257	258	264
	237	241	266	278	293	290	290	295	290
	246	257	270	285	295	300	305	305	310
	249	260	289	297	307	306	315	317	317
	251	258	285	303	314	302	310	309	306
	222	226	245	257	272	267	275	275	272
	260	282	310	318	321	334	337	338	335
	250	268	289	300	310	318	320	323	323
	267	277	294	300	308	308	310	320	317
	249	250	260	270	272	277	278	283	280
Média	247,2	256,3	275,5	286,0	294,2	294,1	297,9	299,8	299,7
DP	13,2	17,2	21,4	20,7	20,5	23,5	23,7	24,7	23,1
EPM	4,0	5,2	6,5	6,2	6,2	7,1	7,2	7,4	7,0

	PC Inicial (g)	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana	5a semana	6a semana	7a semana	8a semana
OVX+hip n=13	257	258	273	290	300	302	297	306	301
	261	243	253	270	288	292	295	303	300
	261	249	270	284	286	286	290	297	292
	255	257	264	276	283	290	299	298	304
	251	252	270	284	310	322	325	328	320
	225	230	249	256	250	262	260	264	260
	245	242	264	285	300	310	318	327	327
	253	250	265	285	295	306	308	312	311
	239	256	267	283	295	290	293	295	294
	241	241	256	266	258	268	272	272	279
	239	240	257	278	296	308	306	318	315
	251	269	270	288	295	311	318	314	312
	265	255	260	277	306	320	325	330	332
	Média	248,2	248,9	263,2	278,8	288,0	295,6	298,4	302,8
DP	11,3	10,1	7,4	18,4	17,5	18,4	19,5	20,3	19,6
EPM	3,1	2,8	2,1	2,7	4,8	5,1	5,4	5,6	5,4

Variación do peso corporal - Grupo HipoPRL

	PC Inicial (g)	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana	5a semana	6a semana	7a semana	8a semana
inta+sal n=10	246	250	273	286	291	291	297	298	302
	235	237	251	259	269	262	269	276	272
	235	244	260	271	280	280	290	292	284
	240	265	286	295	302	308	305	300	306
	245	260	272	288	297	293	300	302	303
	255	265	300	315	325	329	333	337	340
	230	235	249	262	266	268	278	276	284
	245	242	266	276	285	290	295	298	303
	240	246	271	290	300	303	310	310	315
	246	265	290	308	325	332	342	340	341
Média	241,7	250,9	271,8	285,0	294,0	295,6	301,9	302,9	305,0
DP	7,2	11,9	16,5	18,4	20,3	23,2	22,4	21,6	22,6
EPM	2,5	4,2	5,8	6,5	7,2	8,2	7,9	7,6	8,0

	PC Inicial (g)	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana	5a semana	6a semana	7a semana	8a semana
OVX +sal n=8	248	252	255	263	264	259	265	267	273
	225	233	226	229	231	226	233	242	244
	225	230	227	233	235	235	236	240	243
	247	258	259	266	265	262	270	270	269
	236	240	240	236	233	233	237	240	247
	240	248	248	248	245	246	250	263	262
	240	240	244	249	241	246	249	255	262
	240	235	236	238	241	236	241	254	244
Média	237,6	242,0	241,9	245,3	244,4	242,9	247,6	253,9	255,5
DP	8,7	9,8	12,1	13,7	13,3	12,7	13,7	12,2	12,3
EPM	2,8	3,1	3,8	4,3	4,2	4,0	4,3	3,9	3,9

	PC Inicial (g)	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana	5a semana	6a semana	7a semana	8a semana
OVX+bct n=9	246	250	279	294	300	305	312	313	320
	266	270	282	290	300	310	305	293	308
	255	257	274	292	300	300	312	308	313
	243	256	283	303	314	311	329	320	325
	257	270	294	316	333	335	340	340	333
	260	259	268	285	297	300	301	293	298
	252	270	295	313	321	330	334	337	344
	245	255	280	295	305	304	306	305	313
	234	253	267	280	295	296	305	306	315
	Média	250,9	260,0	280,2	296,4	307,2	310,1	316,0	312,8
DP	9,8	7,9	9,9	12,1	12,8	13,6	14,4	16,9	13,7
EPM	3,3	2,6	3,3	4,0	4,3	4,5	4,8	5,6	4,6