

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EDVANINA DE SOUSA COSTA QUEIROZ

EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE FÊMURES E VÉRTEBRAS
LOMBARES DE RATOS ORQUIECTOMIZADOS

SÃO CARLOS
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EDVANINA DE SOUSA COSTA QUEIROZ

EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE FÊMURES E VÉRTEBRAS
LUMBARES DE RATOS ORQUIECTOMIZADOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka.

SÃO CARLOS
2007

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

Q3eo

Queiroz, Edvanina de Sousa Costa.
Efeito do óxido nítrico sobre fêmures e vértebras
lombares de ratos orquiectomizados / Edvanina de Sousa
Costa Queiroz. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
135 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2007.

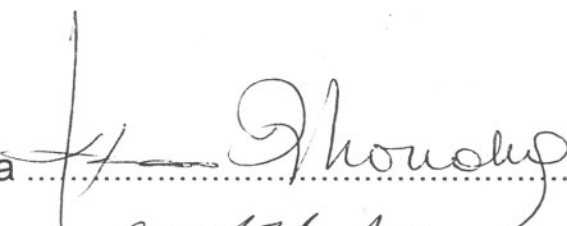
1. Osteoporose. 2. Osteoporose experimental. 3.
Doadores de óxido nítrico (NO). 4. Dinitrato de isossorbida
(ISDN). 5. Biomecânica óssea. 6. Massa óssea. I. Título.

CDD: 616.716 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de Edvanina de Sousa Costa Queiroz

Profa. Dra. Keico Okino Nonaka



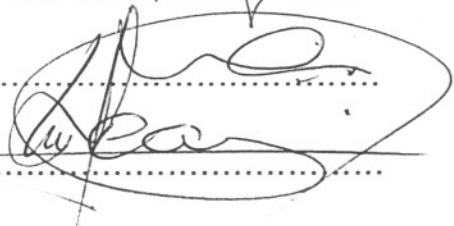
Prof. Dr. Alberto Cliquet Júnior



Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia



Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada



Prof. Dr. João César Bedran de Castro



Profa. Dra. Keico Okino Nonaka
(Orientadora)

Este trabalho recebeu apoio financeiro à pesquisa da FAPESP processo nº 99/03818-5.

Dedico este trabalho ao meu marido e às
minhas filhas pelo companheirismo, apoio,
incentivo e pelo amor verdadeiro.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e por ter me dado força e perseverança para seguir em frente.

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka pela orientação, paciência, amizade, confiança e, principalmente, pelo exemplo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade.

Aos Professores do DCF da UFSCar/UNESP-Araraquara pela contribuição direta ou indireta para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin e à Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin pelo carinho, amizade e apoio ao longo deste período.

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela contribuição e por permitir, gentilmente, a utilização de equipamentos do Laboratório de Histologia e Microscopia (UFSCar).

À Profa. Dra. Cecília Helena de A. G. Ferreira pela contribuição e por permitir, gentilmente, a utilização de equipamentos do Laboratório de Eletromiografia (ICB III – USP, SP).

Ao Departamento de Engenharia de Materiais pela utilização do Laboratório de Caracterização Estrutural (UFSCar).

À Secretária do PPG-CF, Selma, pela paciência e disposição em ajudar sempre.

Aos amigos, Dernival, Fábio, Jucileia, Lidiângela, Lucélia, Luciano e Valéria pela valiosa ajuda, imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos amigos pós-graduandos do DCF – UFSCar/UNESP-Araraquara por compartilhar os momentos sérios e de descontração.

A toda minha família pelo apoio incondicional.

Sinceramente, Muito Obrigada.

*“Faz-se ciência com fatos como uma casa
com pedras, porém, um acúmulo de fatos não
é ciência, exatamente como um monte de
pedras não é uma casa.”*
(Henry Poincaré)

RESUMO

A osteoporose é atribuída a um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, seguido por perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura óssea, levando ao aumento da fragilidade óssea e do risco de fraturas. O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora com efeito regulatório importante sobre a função celular óssea. A nitroglicerina, um doador de NO, tem sido mostrada como uma substância eficiente para atenuar perdas ósseas induzidas por ovariectomia e por corticosteróide. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do NO sobre o osso trabecular e o osso cortical de ratos orquiectomizados. Um total de noventa e oito ratos Wistar com quatro meses de idade foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos: Experimento 1 = intactos tratados com salina (gavagem estomacal - gv), orquiectomizados tratados com salina (gv), orquiectomizados tratados com o doador de NO dinitrato de isossorbida – ISDN (gv); Experimento 2 = intactos tratados com salina (subcutânea - sc), orquiectomizados tratados com salina (sc), orquiectomizados tratados com o inibidor da síntese de NO N^G-nitro-L-arginina-metil ester - L-NAME (sc); Experimento 3 = intactos tratados com salina (intraperitônio - ip), orquiectomizados tratados com salina (ip), orquiectomizados tratados com o precursor de NO L-Arginina - L-ARG (ip); Basal, um grupo foi sacrificado no início do estudo (quatro meses de idade) para servir como linha de base. Os animais foram sacrificados por decapitação após oito semanas de tratamento. Os fêmures e as vértebras lombares (L5 e L6) foram retiradas de cada animal para verificação das mudanças que ocorreram na massa óssea e competência biomecânica do osso trabecular e cortical de cada grupo experimental. O tratamento com o doador de NO, ISDN, preveniu os efeitos deletérios da orquiectomia sobre o osso cortical e atenuou estes efeitos sobre o osso trabecular. O tratamento com L-NAME não intensificou o efeito osteopênico da castração e ainda amenizou tal efeito tanto no osso cortical quanto no osso trabecular. A suplementação com L-arginina realizada durante o período de oito semanas, na dose utilizada, não produziu efeitos significativos. Em conclusão, este estudo sugere que o doador de NO dinitrato de isossorbida pode ser usado no futuro como uma estratégia farmacológica alternativa para a prevenção de osteoporose causada por deficiência androgênica, que acomete homens portadores de hipogonadismo ou são submetidos a orquiectomia.

Palavras-chave: Osteoporose, Doador de NO, ISDN, Competência biomecânica, Massa óssea.

ABSTRACT

Osteoporosis is attributed to an imbalance between bone formation and resorption, followed by bone mass loss and microarchitectural deterioration, leading to increased bone fragility and fracture risk. Nitric oxide (NO) is a signaling molecule with important regulatory effects on bone cell function. Nitric oxide donor nitroglycerin has been reported to alleviate ovariectomy-induced and corticosteroid-induced bone loss. The aim of the present study was to investigate the effect of NO on cancellous and cortical bone of orchietomized rats. A total of 98 male Wistar rats (four months old) were randomly divided in the following groups - Experiment I: intact treated with saline (stomacal gavage - gv), orchietomized treated with saline (gv), and orchietomized treated with NO donor isosorbide dinitrate - ISDN (gv); Experiment II: intact treated with saline (subcutaneous injection - sc), orchietomized treated with saline (sc), and orchietomized treated with NO synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methylester - L-NAME (sc); Experiment III: intact treated with saline (intraperitoneous injection - ip), orchietomized treated with saline (ip), and orchietomized treated with NO precursor L-arginine (ip); Basal group: one group was killed at the beginning of the study (four months old) and served as a baseline group. The animals were killed after 8 weeks of treatment. At death, both femurs and lumbar vertebrae (L5-6) were obtained from each rat, and changes in both cancellous and cortical bone mass and biomechanical competence were assessed. The treatment with NO donor isosorbide dinitrate protected the cortical bone mass of adult rats from the deleterious effects of castration. The protective effect of ISDN treatment on the cancellous bone mass was not as significant as the one observed on the cortical bone. The L-NAME treatment did not increase the deleterious effects induced by orchietomy in both cancellous and cortical bone mass. No effect was observed with the L-arginine treatment, in the dose used in this study. In conclusion, this study suggest that NO donor isosorbide dinitrate can be used in the future as an alternative pharmacological strategy for the prevention of androgen deficiency osteoporosis, in men with proven hypogonadism and in eugonadal men.

Keywords: Osteoporosis, NO donor, ISDN, Biomechanical competence, Bone mass.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Etapas de mono-oxidação da síntese do NO a partir da L-arginina.....	30
FIGURA 2.	Síntese e metabolismo do óxido nítrico (NO).....	32
FIGURA 3.	Esquema da obtenção das medidas de diâmetro externo menor e maior, e de diâmetro interno menor e maior da diáfise femoral, realizadas em secção transversa de fêmures esquerdos de ratos, utilizando-se lupa acoplada a um microscópio, para obtenção da espessura das paredes ósseas.....	42
FIGURA 4.	Curva força-deformação mostrando os diversos parâmetros biomecânicos.....	45
FIGURA 5.	Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos que compõem o experimento 1.....	51
FIGURA 6.	Diâmetros externos maior e menor, e diâmetros internos maior e menor da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 1.....	52
FIGURA 7.	Espessuras das paredes lateral, medial, anterior e posterior da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 1.....	53
FIGURA 8.	Valores de forças aplicadas ao fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos.....	55
FIGURA 9.	Deformações do fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos.....	55
FIGURA 10.	Valores de forças aplicadas ao corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos que compõem o experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão.....	57

FIGURA 11.	Valores de rigidez do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão.....	57
FIGURA 12.	Valores de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6), de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos através de densitometria de duplo fóton.....	60
FIGURA 13.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: peso do osso imerso, peso do osso úmido, peso do osso desidratado, peso das cinzas ósseas, densidade óssea, densidade mineral, percentuais ósseos de água, de material orgânico e de material mineral. Pertencentes aos ratos dos grupos referentes ao experimento 1.....	63
FIGURA 14.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de um exemplar de cada grupo que compõe o experimento 1, exibidas em aumento de 100 vezes.....	64
FIGURA 15.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo BASAL 1.....	65
FIGURA 16.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo INTA 1.....	66
FIGURA 17.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX 1.....	67
FIGURA 18.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX+ISDN.....	68
FIGURA 19.	Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal, de ratos dos grupos que compõem o experimento 2.....	70
FIGURA 20.	Diâmetros externos maior e menor, e diâmetros internos maior e menor da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 2.....	71
FIGURA 21.	Espessuras das paredes lateral, medial, anterior e posterior da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 2.....	72

FIGURA 22.	Valores de forças aplicadas ao fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos.....	74
FIGURA 23.	Deformações do fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos.....	74
FIGURA 24.	Valores de forças aplicadas ao corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos que compõem o experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão.....	76
FIGURA 25.	Valores de rigidez do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão.....	76
FIGURA 26.	Valores de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos através de densitometria de duplo fóton.....	79
FIGURA 27.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: peso do osso imerso, peso do osso úmido, peso do osso desidratado e peso das cinzas ósseas de ratos dos grupos referentes ao experimento 2.....	81
FIGURA 28.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: densidade óssea, densidade mineral óssea, percentuais ósseos de água, de material orgânico e de material mineral de ratos dos grupos referentes ao experimento 2.....	82
FIGURA 29.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de um exemplar de cada grupo que compõe o experimento 2, exibidas em aumento de 100 vezes.....	83
FIGURA 30.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo BASAL 1.....	84

FIGURA 31. Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc), pertencentes ao experimento 2.....	85
FIGURA 32. Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc), pertencentes ao experimento 2.....	86
FIGURA 33. Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc), pertencentes ao experimento 2.....	87
FIGURA 34. Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal, de ratos dos grupos que compõem o experimento 3.....	89
FIGURA 35. Diâmetros externos maior e menor, e diâmetros internos maior e menor da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 3.....	90
FIGURA 36. Espessuras das paredes lateral, medial, anterior e posterior da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 3.....	91
FIGURA 37. Valores de forças aplicadas ao fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 3, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos.....	93
FIGURA 38. Deformações dos fêmures direitos de ratos dos grupos que compõem o experimento 3, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos.....	93
FIGURA 39. Valores de forças aplicadas ao corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos que compõem o experimento 3, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão.....	95
FIGURA 40. Valores de rigidez do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão.....	95

FIGURA 41.	Valores de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos através de densitometria de duplo fóton.....	98
FIGURA 42.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: peso do osso imerso, peso do osso úmido, peso do osso desidratado e peso das cinzas ósseas de ratos dos grupos referentes ao experimento 3.....	100
FIGURA 43.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: densidade óssea, densidade mineral óssea, percentuais ósseos de água, de material orgânico e de material mineral, de ratos dos grupos referentes ao experimento 3.....	101
FIGURA 44.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de um exemplar de cada grupo que compõe o experimento 3, exibidas em aumento de 100 vezes.....	102
FIGURA 45.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo BASAL 3.....	103
FIGURA 46.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip), pertencentes ao experimento 3.....	104
FIGURA 47.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip), pertencentes ao experimento 3.....	105
FIGURA 48.	Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip), pertencentes ao experimento 3.....	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	50
TABELA 2.	Parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	52
TABELA 3.	Parâmetros biomecânicos do fêmur direito de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos através do teste de flexão a três pontos. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	54
TABELA 4.	Parâmetros biomecânicos de corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos a partir de teste de compressão. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	56
TABELA 5.	Valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	59
TABELA 6.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	62

TABELA 7.	Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	69
TABELA 8.	Parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	71
TABELA 9.	Parâmetros biomecânicos do fêmur direito de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos através do teste de flexão a três pontos. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	73
TABELA 10.	Parâmetros biomecânicos de corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos a partir de teste de compressão. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	75
TABELA 11.	Valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	78
TABELA 12.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	81

TABELA 13.	Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	88
TABELA 14.	Parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	90
TABELA 15.	Parâmetros biomecânicos do fêmur direito de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos através do teste de flexão a três pontos. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	92
TABELA 16.	Parâmetros biomecânicos de corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos a partir de teste de compressão. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	94
TABELA 17.	Valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	97
TABELA 18.	Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1α 25-(OH) $_2$ D $_3$	Um alfa, 25 diidroxivitamina D $_3$
2N	Dois normais
AAAD	Aging-associated androgen deficiency
ADAM	Androgen deficiency in the aging male
BH $_4$	Tetrahidrobiopterina
BMC	Conteúdo mineral ósseo
BMD	Densidade mineral óssea
Ca $^{++}$	Cálcio
CFS	Fatores estimuladores de colônias
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GFs	Fatores de crescimento
GH	Hormônio de crescimento
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
gv	Gavagem
iCa $^{++}$	Cálcio livre intracelular
IFN	Interferons
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina

IL	Interleucinas ou interleuquinas
IL-6R	Receptores da interleucina 6
TNF	Fator de necrose tumoral
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INTA	Intactos
ip	Intraperitonal
ISDN	Dinitrato de isossorbida
L5	Quinta lombar
L6	Sexta lombar
L-arg	L-arginina
L-NA	N ^G -nitro-L-arginina
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil ester
L-NMMA	N ^G - monometil-L-arginina
LPS	Lipopolisacarídeos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
N	Nitrogênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NG	Nitroglicerina
NMDA	N-metil-d-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio

O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
OPG	osteoprotegerin
ORX	Orquiectomia
OVX	Ovariectomia
PAM	Pressão arterial média
PC	Peso corporal
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PTH	Paratormônio ou hormônio da paratireóide
PTH (1-34)	Análogo do PTH contendo os primeiros 34 aminoácidos da molécula
RANK	Receptor activator of nuclear factor- κ B (NF- κ B)
RANKL	Ligante do RANK
Ratas OVX	Ratas ovariectomizadas
Ratos ORX	Ratos orquiectomizados
sc	Subcutâneo
SDs	Desvios padrão
SERMs	Moduladores seletivos de receptores de estrogênios
SIN-1	3-morfolino sidnonimina
TRA	Terapia de reposição androgênica
TRH	Terapia de reposição hormonal
VL5	Quinta vértebra lombar
VL6	Sexta vértebra lombar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Osteoporose.....	22
1.2 Modelo Experimental de Osteoporose.....	26
1.3 Óxido Nítrico.....	28
1.4 Avaliação Óssea Experimental.....	37
1.5 Objetivo.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 Animais.....	39
2.2 Orquiectomia.....	39
2.3 Tratamentos.....	39
2.4 Protocolo Experimental.....	40
2.5 Parâmetros Estudados.....	41
2.6 Análise Estatística.....	49
2.7 Normas Técnicas Referentes à elaboração do Trabalho.....	49
3 RESULTADOS.....	50
3.1 Experimento 1.....	50
3.2 Experimento 2.....	69
3.3 Experimento 3.....	88
4 DISCUSSÃO.....	107
5 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
APÊNDICES.....	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 Osteoporose

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea, com deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas (PINTO NETO et al., 2002; DARIPA et al., 2004).

Para prover uma definição mais quantitativa e de uso clínico, em 1994 a Organização Mundial de Saúde definiu osteoporose e osteopenia com base na mensuração da massa óssea. Um indivíduo que possui uma densidade mineral óssea (BMD) ou um conteúdo mineral ósseo (BMC) de 2,5 desvios padrão (SDs) ou mais, abaixo do valor médio para adultos jovens normais, deve ser considerado tendo osteoporose. Enquanto que, uma mensuração de BMD ou BMC entre 1-2,5 SDs abaixo do valor médio para adultos jovens normais, deve ser definida como osteopenia. E ainda, aqueles que apresentam valores de BMD ou BMC, maiores do que 2,5 SDs abaixo dos valores médios para adultos jovens normais, juntamente com a presença de uma ou mais fraturas, possuem osteoporose severa ou osteoporose estabelecida (KANIS et al., 1994).

A osteoporose tem sido classificada, por muitos anos, como osteoporose primária e secundária. A osteoporose primária é, por tradição, uma desordem esquelética que acomete mulheres após a menopausa (osteoporose "pós-menopausal") ou homens e mulheres idosos (osteoporose "senil"). Por outro lado, o termo osteoporose secundária refere-se à perda óssea resultante de desordens clínicas definidas ou de uso de drogas que causam perda óssea. Porém, devido à relação íntima da deficiência de hormônios da reprodução com o desenvolvimento da osteoporose pós-menopausal, várias condições que podem, legitimamente, serem consideradas formas secundárias de osteoporose, são comumente tratadas como variações da osteoporose primária. Estas incluem, osteoporose resultante de amenorréia relacionada a exercícios físicos excessivos e de tumores secretores de prolactina. Adicionalmente, existe um entendimento geral de que síndromes raras de osteoporose juvenil, que ocorrem em crianças próximas da puberdade, e osteoporose idiopática, que ocorrem em adultos jovens de ambos os sexos, possam ser consideradas entidades separadas (MARCUS, 1996). Riggs; Melton (1983) propõem o uso do termo "osteoporose involucional" para

descrever a osteoporose decorrente de falhas gerais do metabolismo ósseo e do cálcio, comuns no decorrer da idade adulta, que representam cerca de 75% do total. Os autores sugerem, também, que a osteoporose involucional seja dividida em osteoporose tipo I e osteoporose tipo II. Onde, a osteoporose tipo I refere-se à perda de massa óssea após a menopausa e a osteoporose tipo II representa a perda óssea relativa à idade que acomete homens e mulheres.

A osteoporose é atribuída a um desequilíbrio negativo e prolongado entre formação e reabsorção óssea. Este desequilíbrio no processo de remodelação óssea pode resultar do aumento da reabsorção óssea, mediado por osteoclastos, da diminuição da formação óssea, mediada por osteoblastos, ou de ambos. Conseqüentemente, as cavidades reabsortivas deixam de ser completamente preenchidas gerando diminuição da massa óssea (PARFITT, 1987; WANG et al., 2004; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006). Tanto a substância óssea cortical quanto a trabecular são afetadas, embora nem sempre igualmente. O efeito sobre o osso cortical inclui afinamento do córtex e aumento da porosidade cortical. No osso trabecular, o efeito inclui afinamento das trabéculas e perda de conectividade trabecular. Portanto, o desequilíbrio prolongado do processo de remodelação óssea gera fragilidade e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo trabecular e cortical (RIZZOLI; BONJOUR; FERRARI, 2001; PEACOCK et al., 2002).

A patofisiologia da osteoporose é complexa. Além de se tratar de uma doença multifatorial, ela apresenta fatores interdependentes que influenciam tanto o acúmulo de massa óssea durante a fase de crescimento, quanto à manutenção dessa massa durante toda a vida adulta (ZAJICKOVA; ŽOFKOVA, 2003). Estes determinantes classicamente incluem fatores genéticos, raça, gênero (sexo), nutrição (aquisição de quantidades adequadas de cálcio, proteínas e fosfato), fatores endócrinos (esteróides sexuais, calcitriol, IGF-I), forças mecânicas (atividade física, peso corporal), e exposição a fatores de riscos (RIZZOLI; BONJOUR; FERRARI, 2001). De maneira geral, os fatores de risco são: tabagismo, alcoolismo, magreza excessiva, uso abusivo de glicocorticóides, além de várias doenças e condições denominadas, também, de causas secundárias que são: hipercortisolismo (endógeno e exógeno), hiperparatireoidismo primário ou secundário, hipertireoidismo, acromegalia, artrite reumatóide, cirrose biliar primária, espondilite anquilosante, anemia hemolítica, anorexia nervosa, imobilização prolongada, doenças inflamatórias intestinais, dentre outras (FROST; JEE, 1992; PINTO NETO et al., 2002; SEEMAN; EISMAN, 2004).

Fisiologicamente, a remodelação óssea está sob controle endócrino (CUZZOCREA et al., 2003). Os hormônios gonádicos medeiam a e têm sua ação mediada por

outros fatores na preservação da homeostasia do tecido ósseo (VÄÄNÄNEN, 1991). Os hormônios sexuais femininos são mandatários não somente para aquisição de um pico de massa óssea favorável, tanto em mulheres quanto em homens, mas também para a manutenção da massa óssea de ambos, quando adultos. Analisando a deficiência estrogênica em mulheres de diferentes faixas etárias, Burckhardt et al. (1991), mostram que este fator provoca perda óssea importante na pré-menopausa, é a principal causa da perda óssea rápida na pós-menopausa e contribui também para perdas ósseas associadas ao avanço da idade. Em adição, a deficiência estrogênica parece estar relacionada com o aumento progressivo dos níveis séricos de PTH em indivíduos idosos, o que contribui para acelerar o turnover ósseo (KHOSLA et al., 1998; RIZZOLI; BONJOUR; FERRARI, 2001).

No homem, a perda óssea referente à deficiência de hormônios sexuais é, geralmente, menor e gradativa, se comparada às mulheres; porém, não menos importante (JOHNSTON; SLEMENDA, 1995). Isso porque a secreção de andrógenos não cessa, ela diminui gradualmente, mas continua em algum nível. Assim sendo, o declínio dos níveis de testosterona (principal andrógeno masculino circulante), que ocorre com o avanço da idade, associado aos sinais e sintomas de deficiência androgênica, deve ser chamado de deficiência androgênica associada à idade (AAAD – Aging-associated androgen deficiency or ADAM – androgen deficiency in the aging male) e não de “andropausa” como é chamado freqüentemente pela imprensa leiga, leigos e clínicos. Dentre os sinais e sintomas decorrentes da deficiência de testosterona encontram-se diminuição da força e da massa muscular, osteopenia e osteoporose. Osteopenia e osteoporose são comuns em homens que: sofrem de hipogonadismo congênito, fazem terapia com privação de andrógenos para câncer de próstata, apresentam deficiência severa de testosterona (decorrente, principalmente, da redução de células de Leydig nos testículos), e apresentam deficiência estrogênica (HIJAZI; CUNNINGHAM, 2005).

A testosterona pode influenciar a homeostasia do tecido ósseo direta ou/ indiretamente. Apesar da quantidade de receptores androgênicos encontrados nos osteoblastos ser menor do que aquela encontrada em tecidos alvos como a próstata, a afinidade hormônio-receptor é semelhante, e a presença de testosterona em níveis normais favorece, diretamente, a formação óssea (VANDERSCHUEREN; BOUILLON, 1995). Por outro lado, a deficiência de testosterona interfere negativa e indiretamente na aquisição de um pico de massa óssea apropriado, uma vez que causa diminuição da massa e da força muscular, desfavorecendo o processo de formação óssea e, conseqüentemente, promovendo uma redução do pico de massa óssea (SCHÖNAU, 2004). O pico de massa óssea, que corresponde a maior quantidade de

massa óssea alcançada por um indivíduo, é adquirido durante as três primeiras décadas de vida (DARIPA et al., 2004). E, de acordo com Väänänen (1991), o nível de massa óssea em cada indivíduo, a partir da quarta década de vida, é determinado não somente pela frequência e duração de perdas ósseas, mas também pelo pico de massa óssea atingido.

Recentemente, o conhecimento sobre o papel que a deficiência estrogênica disputa na patogênese da osteoporose pós-menopausal e sobre o mecanismo de ação do estrogênio no osso, tem crescido consideravelmente. Existe, principalmente, um reconhecimento de que o estrogênio regula a remodelação óssea por modulação da produção de citocinas e fatores de crescimento provenientes das células ósseas e medulares. De maneira geral, as citocinas relacionadas ao metabolismo ósseo são divididas em seis grupos distintos: interleucinas (IL), interferons (IFN), fatores de crescimento (GFs), fatores estimuladores de colônias (CFS), neuropeptídeos e outras citocinas ativas (WALLACH, 1993). As citocinas são fatores localmente ativos (autócrinos ou parácrinos), usualmente peptídeos ou glicoproteínas, que são produzidas por células imunologicamente competentes, células tumorais, células ósseas e células estromais da medula óssea (MUNDY et al., 1996). A concentração de certas citocinas, principalmente da IL6, aumenta com a idade tanto em homens quanto em mulheres. Estas citocinas potencializam a reabsorção óssea osteoclástica, contribuindo para o surgimento da osteoporose relacionada à idade. Além disso, foi encontrado um aumento considerável dos níveis de IL6 e de seus receptores (IL-6R) no sobrenadante de células da medula óssea de camundongos machos velhos ou adultos jovens orquiectomizados, indicando que a diminuição dos níveis de andrógeno ocasiona um aumento dos níveis de IL6 (ERSHLER; HARMAN; KELLER, 1997). Embora o mecanismo pelo qual essas citocinas modulam o turnover ósseo não esteja completamente esclarecido, sabe-se que segundos mensageiros como prostaglandinas e óxido nítrico (NO) estão envolvidos neste processo (GOLDRING; GOLDRING, 1990; EVANS; RALSTON, 1996; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

As principais manifestações clínicas da osteoporose são as fraturas, sendo mais frequentes as de vértebras, fêmur e antebraço. A incidência de fraturas associadas à osteoporose cresce exponencialmente em todo o mundo, particularmente, com o aumento da longevidade da população (WIMALAWANSA, 1993; JOHNSTON, 1996; ERSHLER; HARMAN; KELLER, 1997; SEEMAN; EISMAN, 2004). No Brasil, devido ao envelhecimento progressivo da sociedade, as fraturas osteoporóticas já são consideradas um problema de saúde pública em ambos os sexos, e causam graves conseqüências físicas,

financeiras e psicossociais, que afetam o indivíduo, a família e a comunidade (CARNEIRO, 2001; RAMALHO et al., 2001; PINTO NETO et al., 2002).

Diversos fármacos são utilizados no tratamento da osteoporose e são considerados eficazes aqueles que primariamente reduzem os riscos de fraturas em estudos controlados. Estes fármacos são divididos em dois grupos: os agentes anti-reabsortivos e os estimulantes da formação óssea. A terapia de reposição hormonal (TRH), os moduladores seletivos de receptores de estrogênios - SERMs (raloxifeno), os bifosfanatos, a calcitonina, o cálcio e a vitamina D (colecalfiferol, ergocalciferol, calcitriol) são considerados agentes anti-reabsortivos, enquanto o PTH (1-34) na dose de 20 µg uma vez ao dia é considerado estimulante da formação (WIMALAWANSA, 2000b; PINTO NETO et al., 2002). Porém, o fato da osteoporose ser uma doença crônica, faz com que o organismo fique exposto ao tratamento durante um longo período de tempo. Esta exposição prolongada provoca efeitos adversos preocupantes, peculiares a cada fármaco, fazendo com que constantes investigações em busca de novas terapias sejam realizadas (SEEMAN; EISMAN, 2004).

No homem, o tratamento da osteoporose requer ainda mais atenção, uma vez que não existem evidências da eficácia de drogas antifraturas. A terapia de reposição androgênica (TRA) é indicada para homens com hipogonadismo comprovado, mas não para homens eugonadais. Além disso, a TRA tem indicações restritas, considerando-se as repercussões cardiovasculares, os impactos hepáticos e renais, a hiperplasia prostática e possível desenvolvimento de câncer de próstata. Assim, a relação risco/benefício da terapia de reposição de testosterona em homens, não é conhecida (SEEMAN; EISMAN, 2004; HIJAZI; CUNNINGHAM, 2005).

1.2 Modelo Experimental de Osteoporose

Diversos trabalhos têm demonstrado que o rato pode prover um modelo experimental adequado para o estudo da osteopenia e osteoporose humana, apesar de não apresentar sistema haversiano característico, nem fraturas osteoporóticas (HODGKINSON, 1979; KALU, 1991; DANIELSEN; MOSEKILDE; ANDREASSEN, 1992; FROST; JEE, 1992; PENG et al., 1994; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995).

O uso de um modelo animal no estudo de diversos aspectos da perda óssea, não precisa ser uma réplica exata da condição humana. Além disso, a escolha de ratos como

modelo animal para o estudo da osteoporose humana atende, satisfatoriamente, aos seguintes fatores: uso de um animal vivo, no qual a perda óssea espontânea ou induzida possa ser extensivamente estudada; características e seqüelas da perda óssea semelhantes às aquelas encontradas em humanos; conveniências referentes aos custos experimentais, duração e manuseio dos animais (KALU, 1991).

Os mecanismos de controle do ganho e da perda de massa óssea em ratos e humanos, jovens e velhos, são muito semelhantes. O tecido ósseo dessas duas espécies responde similarmente a estímulos mecânicos, hormonais e farmacológicos. E ainda, experimentos com ratos necessitam apenas de 25% do tempo e 10% do custo dos experimentos com cães ou primatas (FROST; JEE, 1992).

Existe uma grande variedade de condições experimentais que levam a uma reação osteopênica. Estas condições estão geralmente ligadas a deficiências ou excessos endócrinos. Dentre estas, as mais comuns incluem: ovariectomia, orquiectomia, hipofisectomia, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo, diabetes induzido, adrenalectomia e glicocorticóides aumentados (MILLER; BROWMAN; JEE, 1995).

Ratas OVX é o modelo mais popular em estudos de eventos associados à osteopenia pós-menopausal (MILLER; BROWMAN; JEE, 1995). Este modelo é recomendado para avaliar a eficiência de agentes com potenciais terapêuticos para a prevenção e tratamento deste tipo de osteopenia (THOMPSON et al., 1995). A OVX experimental é utilizada também, em estudos dos efeitos imediatos da deficiência de hormônios ovarianos sobre o tecido ósseo e sobre os hormônios que regulam o metabolismo do cálcio em humanos. A OVX em ratas deve ser realizada a partir dos três meses de idade, nas quais seus efeitos se manifestam após um mês ou menos (KALU, 1991).

Ratos velhos ou ratos ORX aos quatro meses de idade apresentam diminuição da massa óssea trabecular e cortical. Portanto, ratos ORX representam um modelo experimental proveitoso em estudos referentes à osteopenia induzida pela deficiência androgênica (MILLER; BOWMAN; JEE, 1995). Este modelo pode ser útil, por exemplo, para a investigação da patogênese da osteoporose que acomete homens portadores de hipogonadismo ou são submetidos à ORX. Estudos *in vitro* mostraram que osteoblastos de ratos e de seres humanos possuem receptores androgênicos (ORWOLL et al., 1991) e apresentam variações fisiológicas similares quando expostos a andrógenos (SOMJEN et al., 1989). No entanto, a ligação entre hormônios gonádicos e saúde óssea, tem sido menos estudada em animais do sexo masculino (GUNNESS; ORWOLL, 1995).

1.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um radical livre de vida curta, que se apresenta sob a forma de gás inorgânico incolor, de fórmula $\bullet\text{N}=\text{O}$, abreviada como NO.

Histórico

A descoberta do NO como uma molécula com atividades biológicas, ocorreu a partir do trabalho de Furchgott; Zawadzki (1980). Neste trabalho pioneiro, os autores demonstraram que o relaxamento de preparações isoladas da aorta torácica de coelho, promovido pela acetilcolina, requeria a presença de células endoteliais. Ainda nesse estudo, os autores propuseram que a acetilcolina agia sobre os receptores muscarínicos das referidas células, estimulando a liberação de uma substância que causaria o relaxamento da musculatura lisa vascular.

A descoberta de que a acetilcolina só agia como vasodilatador na presença do endotélio desencadeou uma era de intensos trabalhos na década de 1980. E a partir destes, postulou-se a existência de um fator relaxante derivado do endotélio, que em 1982 foi denominado de Endothelium-derived relaxing factor (EDRF). Determinou-se, também, que o EDRF não era um prostanóide, que era difusível e dependente de íons cálcio (EVORA et al., 1996).

Experimentos *in vitro* com células endoteliais isoladas, instaladas em um circuito de perfusão, permitiram a obtenção de grandes quantidades de EDRF, possibilitando a realização de manipulações bioquímicas e farmacológicas. Estas mostraram uma associação entre o relaxamento dependente do endotélio e a elevação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) na musculatura lisa vascular. Além disso, esses bioensaios mostraram um acúmulo de evidências de que o EDRF possuía muitas das características dos nitrovasodilatadores (COCKS et al., 1985).

Palmer; Ferrige; Moncada (1987) mostraram que células endoteliais, quando estimuladas, sintetizavam NO em quantidade suficiente para promover o efeito do EDRF. Mostraram, também, que as duas substâncias eram igualmente instáveis e que o relaxamento induzido por ambas era inibido pela hemoglobina e acentuado pela superóxido-dismutase, a uma proporção similar. E deste modo, que o NO e o EDRF liberados a partir de células endoteliais eram indistinguíveis em termos de atividades biológicas, estabilidade e

suscetibilidade a um inibidor e a um potencializador, sugerindo que o EDRF e o NO eram idênticos. Em seguida, Ignarro et al. (1987) postularam que o EDRF era o óxido nítrico, provocando a realização de diversas pesquisas visando determinar a síntese do NO.

Palmer; Ashton; Moncada (1988), utilizando células endoteliais aórticas de coelho e de porco, demonstraram que o NO era sintetizado a partir dos átomos de nitrogênio do terminal guanidino do aminoácido L-arginina. Estes autores postularam que essa síntese ocorria sob a ação de uma enzima formadora de NO.

Por outro lado, Garthwaite; Charles; Chess-Williams (1988), relataram que células cerebrais de ratos, induzidas pela ação do glutamato sobre receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), liberavam um mensageiro com propriedades, surpreendentemente, similares às do NO. Relataram também, que esse mensageiro era liberado de maneira dependente do cálcio extracelular e que sua atividade estimulava a produção de GMPc. Ainda neste estudo, os autores verificaram que o aumento do GMPc era inibido por hemoglobina e acentuado pela superóxido desmutase. Sugerindo, portanto, que os neurônios e as células vasculares sintetizavam NO pelo mesmo mecanismo.

Adicionalmente, Marletta et al. (1988) mostraram que macrófagos de roedores, induzidos por citocinas, produziam NO, também, a partir da L-arginina.

A descoberta de que diversas células eram capazes de sintetizar NO a partir da L-arginina, sob ação das enzimas formadoras de NO, foi recebida, inicialmente, com considerável ceticismo por muitos biólogos. Porém, nos anos seguintes, a existência da via L-arginina – NO já estava perfeitamente documentada e sua relevância biológica está sendo lentamente esclarecida. Além disso, tal descoberta levou ao aparecimento de um novo e vigoroso campo de pesquisas, evidenciado pelo aumento do número de publicações referentes a este mediador biológico (KNOWLES; MONCADA, 1994).

Síntese

O NO é gerado endogenamente por um grupo de enzimas denominado de Óxido Nítrico Sintase (NOS). Estas sintetizam NO por combinação do oxigênio molecular com o terminal nitrogênio guanidino do aminoácido L-arginina, gerando L-citrulina como um coproduto (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA; HIGGS, 1993). O NO também pode ser gerado, não enzimaticamente, a partir de nitrito no ambiente ácido do estômago (BENJAMIN et al., 1994) e, farmacologicamente, por compostos tais como os nitratos orgânicos (exemplos: dinitrato de isossorbida e nitroglicerina), além do nitroprussiato

de sódio, que são usados clinicamente como vasodilatadores (Figura 2). Estes compostos são conhecidos como doadores de NO (FEELISCH, 1993).

A síntese de NO proveniente da L-arginina é uma reação que envolve duas etapas separadas de mono-oxigenação. A primeira requer um O_2 e uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), além da presença da tetrahydrobiopterina (BH_4). Esta etapa resulta na formação da N-hidroxi-L-arginina, que é o único intermediário identificado. A segunda etapa da reação é o resultado da oxidação deste intermediário para formar L-citrulina e NO (Figura 1) (KNOWLES; MONCADA, 1994).

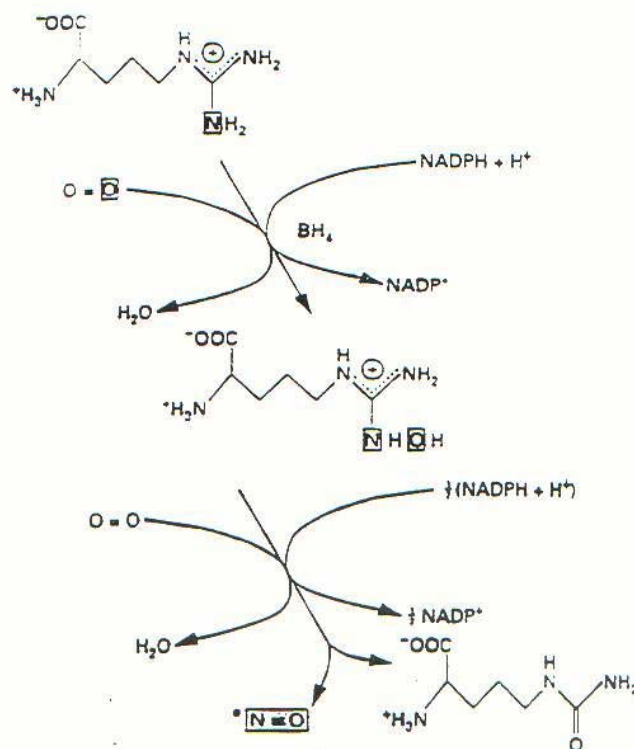


Figura 1 - Etapas de mono-oxigenação da síntese do NO a partir da L-arg. Os átomos de O e N, que estão contidos nos retângulos, mostram a origem dos átomos que constituem o NO (KNOWLES; MONCADA, 1994).

Está bem estabelecido que a catálise da L-arginina ocorre sob a ação de três isoformas distintas de NOS (KNOWLES; MONCADA, 1994). Uma forma neuronal (nNOS ou NOS1), inicialmente isolada a partir de neurônios (BREDT et al., 1991); uma forma

endotelial (eNOS ou NOS3), inicialmente isolada a partir de células do endotélio vascular (ROBINSON et al., 1994); e uma forma induzível (iNOS ou NOS2), inicialmente isolada a partir de macrófagos (LOWENSTEIN et al., 1992). As isoenzimas nNOS e eNOS são constitutivamente expressas em seus tecidos de origem e por esta razão são coletivamente chamadas de formas constitutivas de NOS (cNOS). Ao passo que a iNOS recebe esta denominação por ter sua expressão induzida pela exposição celular a mediadores inflamatórios e produtos bacterianos (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999).

Durante a produção de NO, as atividades das enzimas constitutivas eNOS e nNOS são reguladas principalmente por mudanças da concentração intracelular de cálcio livre ($[iCa^{++}]$). Quando a $[iCa^{++}]$ se eleva no citoplasma, o Ca^{++} se liga à calmodulina e ativa a cNOS, levando à formação de NO (Figura 2) (RALSTON et al., 1995). Estudo subsequente mostrou que a eNOS pode ser ativada, também, por certas citocinas através da via IP3/akt. A proteína quinase akt fosforila a proteína eNOS na serina 1177 ativando esta enzima (MICHELL et al., 1999). Pouco é conhecido sobre os fatores que regulam a expressão da nNOS em sua transcrição, mas tem sido mostrado que o gene promotor da eNOS contém vários elementos responsivos ao estrógeno e ao estresse por cisalhamento. Assim sendo, células endoteliais expostas a estresse por cisalhamento e estrógeno, apresentam aumento de mRNA da eNOS (VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Por outro lado, a produção de NO catalisada pela forma de NOS independente de cálcio (iNOS), pode ser estimulada através da interação de citocinas ou lipopolissacarídeos (LPS) com seus receptores (Figura 2), que resulta em ativação transcricional do seu gene, e pode ocorrer em muitas células incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células mesangiais, hepatócitos, condrócitos, células ósseas e da medula óssea, células musculares lisas e esqueléticas (MONCADA; HIGGS, 1993).

Apesar da extensiva pesquisa já realizada, o mecanismo preciso pelo qual as NOSs catalisam a oxidação da L-arginina a NO permanece não esclarecido. Parece que muitos aspectos da bioquímica da NOS referem-se diretamente às ações do citocromo P-450. A NADPH age como uma fonte de elétrons para a ativação do oxigênio e oxidação do substrato. A flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) lançam elétrons provenientes da NADPH ao ferro do grupo heme (Figura 2). O grupo heme da NOS assemelha-se ao citocromo P-450, dando suporte à hipótese de que o componente heme da NOS representa o centro catalítico responsável pela ligação e redução do oxigênio molecular e subsequente oxidação do substrato. Em contraste ao citocromo P-450, a NOS requer BH_4 para sua atividade máxima. As isoformas da NOS estão sujeitas a um controle por

retroalimentação negativa mediado pelo NO, presumivelmente, via ligação do NO com o grupo heme. Além disso, o BH₄ é capaz de prevenir e reverter essa via de controle e, embora a explanação para isso não esteja bem esclarecida, esse pode ser um papel para o BH₄ como cofator (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999).

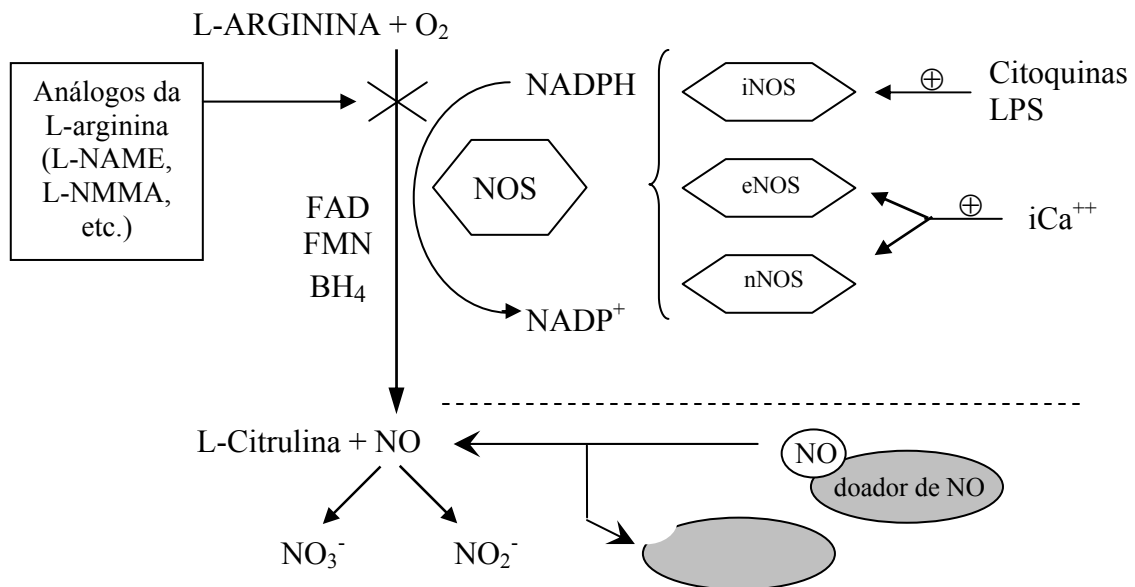


Figura 2: Síntese e metabolismo do óxido nítrico (NO). FAD, flavina adenina dinucleotídeo; FMN, flavina mononucleotídeo; BH₄, tetrahydrobiopterina; NADP, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NOS, óxido nítrico sintase; iNOS, NOS induzível; eNOS, NOS endotelial; nNOS, NOS neuronal; LPS, lipopolissacarídeo; iCa⁺⁺, cálcio intracelular; L-NAME, N^G-nitro-L-arginina-metil ester; L-NMMA, N^G-monometil-L-arginina; NO₃⁻, nitrato; NO₂⁻, nitrito (EVANS; RALSTON, 1996; VAN'T HOF; RALSTON, 2001).

Expressão das Isoformas de NOS em Osso

Vários estudos mostram que a eNOS é a isoforma predominantemente expressa no osso sobre bases constitutivas. Ela é largamente encontrada em células estromais da medula óssea, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (SAMUELS et al., 2001).

Embora a expressão de mRNA da nNOS tenha sido detectada no osso (HELFRICH et al., 1997), e investigações, utilizando culturas de células ósseas provenientes de camundongos com inativação do gene da nNOS, sugeriram que a nNOS participa da regulação da massa óssea e do turnover ósseo, vários trabalhos realizados com o objetivo de mostrar expressão da proteína nNOS, neste tecido, não obtiveram êxito (VAN'T HOF et al., 2004). Apenas um trabalho no qual se utilizou uma metodologia diferenciada (anticorpo

diferente do usual), apresentou evidências de expressão da referida proteína em células de revestimento ósseo e em osteócitos (FOX; CHOW, 1998).

A expressão da iNOS tem sido mostrada em osso fetal, mas parece não ser constitutivamente expressa em osso adulto normal. Contudo, a expressão da iNOS pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias e/ou endotoxinas em osteoblastos, em células da medula óssea, e, fracamente, em osteoclastos e células preosteoclásticas (VAN'T HOF; RALSTON, 2001).

Metabolismo

O NO é um gás que na ausência de oxigênio livre dissolve-se em água, sendo muito estável nessas condições. No ar, o NO reage rapidamente com o oxigênio para formar dióxido de nitrogênio, que é um gás marrom capaz de causar danos teciduais ao ser humano. Na água, ultrafiltrado e plasma, em condições aeróbias, o NO é espontaneamente oxidado a nitrito (NO^-_2), que é estável por várias horas. No sangue total, contudo, o nitrito é rapidamente convertido a nitrato (NO^-_3), fazendo com que a meia-vida do NO seja da ordem de segundos e sua mensuração direta seja difícil (MONCADA; HIGGS, 1993; EVANS; RALSTON, 1996).

Inibidores da Síntese ou da Atividade

Os compostos capazes de prevenir a síntese ou a atividade biológica do NO podem ser agrupados dentro de seis principais categorias, de acordo com seus mecanismos de ação (FUKUTO; CHAUDHURI, 1995). Estes incluem:

- Agentes inibidores da via de fluxo de elétrons NADPH/flavinas e agentes que interferem no grupo heme.
- Agentes que reduzem o suprimento de cofatores requeridos para a oxidação da L-arginina, incluindo seqüestradores de Ca^{++} , inibidores da síntese de BH_4 e antagonistas da calmodulina.
- Drogas que previnem a entrada de L-arginina nas células.
- Inibidores da expressão da NOS.
- Drogas que previnem a ligação do substrato à NOS.
- Agentes seqüestradores de NO.

Nos últimos dez anos, as drogas que interferem sobre a ligação do substrato à NOS têm sido as mais extensivamente estudadas. Alguma seletividade para as isoformas da

NOS tem sido conseguida com análogos da L-arginina, que previnem a ligação do substrato por competição. O uso destes análogos oferece vantagens sobre outros reputados agentes inibidores. Pois, sendo intimamente relacionados ao próprio substrato, podem ser captados eficientemente pelas células via transportadores de aminoácidos. Dentre estes inibidores, o N^G-nitro-L-arginina (L-NA), o N^G-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME) e o N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), que são inibidores inespecíficos das isoformas de NOS (Figura 2), têm sido usados para identificar diversas ações fisiológicas do NO, bem como para investigar seu papel em alguns processos patológicos (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999).

Mecanismo de Ação

O NO é uma molécula altamente reativa e por isso tem muitos alvos moleculares em potencial. O NO reage com radicais livres derivados do oxigênio, tais como os ânions superóxidos (O₂⁻), para formar moléculas reativas como o ânion peroxinitrito (ONOO⁻) e o radical hidroxil. A produção de tais substâncias tóxicas pode contribuir para danos teciduais que é um aspecto característico da resposta inflamatória, por indução de peroxidação lipídica. Outros efeitos biológicos do NO são mediados pela sua habilidade de reagir com resíduos sulfidrílicos e centro ferro-enxofre nas proteínas. O efeito sobre o centro ferro-enxofre é tido como responsável pelo efeito inibitório de altas concentrações de NO sobre o crescimento celular via interação com a aconitase mitocondrial, uma enzima crítica no ciclo de Krebs. O NO interage também com o grupo heme das enzimas NOS. Esta interação provoca mudanças conformacionais nestas enzimas, que resultam em inibição de suas ações, promovendo um feedback autoregulatório de suas atividades, de modo que níveis aumentados de NO limitam a produção do próprio NO (VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Muitas das ações fisiológicas do NO são conduzidas por ativação da guanilato ciclase solúvel. A ligação do NO ao grupo heme dessa enzima causa-lhe uma mudança conformacional, que aumenta a sua atividade e resulta em formação de GMPc (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999).

O alvo molecular para a ação do NO em células ósseas é pobremente conhecido. Acreditava-se inicialmente que o efeito inibitório do NO sobre a reabsorção óssea osteoclástica era mediado por um mecanismo independente de GMPc, mas evidências mais recentes sugerem que vias dependentes de GMPc podem estar envolvidas (MANCINI et al., 2000).

Novos estudos mostram ainda que um fator solúvel denominado osteoprotegerina (OPG) e um membro da família de receptores de TNF α chamado RANK

[receptor activator of nuclear factor- κ B (NF- κ B)] e seu ligante (RANKL), produzidos por células estromais osteogênicas, disputam um papel fundamental no mecanismo de regulação da osteoclastogênese. O RANKL está envolvido com a diferenciação e função de células precursoras de osteoclastos, enquanto o OPG age como um receptor isca para bloquear a interação do RANKL com seu receptor funcional RANK, inibindo deste modo, a osteoclastogênese (VAN'T HOF; RALSTON, 2001; CUZZOCREA et al., 2003; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006). Estudo adicional mostra que doador de NO pode atenuar a osteoclastogênese no microambiente ósseo de camundongos ovariectomizados, através do aumento dos níveis de OPG. Porém, a via de transdução de sinal que regula a expressão de OPG, que é importante para a compreensão completa da atenuação de doador de NO em perdas ósseas, permanece indeterminada (WANG et al., 2004).

Efeitos do NO sobre o Osso

O NO parece ser um potente regulador do metabolismo ósseo. Desta forma, as células ósseas produzem NO em resposta a vários estímulos incluindo citocinas pró-inflamatórias, estrógeno e estímulos mecânicos. Estudos utilizando culturas de células osteoblásticas humanas e de roedores, estabeleceram que a proliferação e diferenciação de osteoblastos, estimuladas por 17β -estradiol, são dependentes de NO e, portanto, que o efeito do NO não estaria confinado exclusivamente à inibição osteoclástica (O'SHAUGHNESSY et al., 2000).

A produção constitutiva de NO nos osteoclastos parece ser essencial para sua função normal, uma vez que inibidores da NOS inibem a atividades e mobilidade de osteoclastos isolados, dificultando assim, o processo natural de remodelação óssea. Contudo, fortes evidências sugerem que o NO tem efeito bifásico sobre a atividade osteoclástica. Quando em baixas concentrações, o NO parece potencializar a reabsorção óssea osteoclástica induzida por IL-1, enquanto que, em concentrações elevadas inibe a formação e a atividade osteoclástica, além de causar apoptose de progenitores osteoclásticos (VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Observações feitas com base em diversos estudos, *in vitro*, mostram que as altas concentrações de NO podem ser responsáveis pelo efeito inibitório do IFN γ sobre a reabsorção óssea estimulada por IL-1, IL-6 e TNF α (RALSTON et al., 1995), e que estas citocinas de efeito pró-reabsortivo agem através da produção de grande quantidade de prostaglandinas E₂ (PGE₂), que é o mediador desse efeito. Diante destes fatos, os autores

propuseram que o NO e a PGE₂ modulam a reabsorção óssea induzida por citocinas. Esta modulação depende do balanço entre a quantidade de NO e de PGE₂ produzida por indução de diferentes combinações de citocinas pró-inflamatórias (RALSTON; GRABOWSKI, 1996).

O NO parece ter efeito bifásico, também, sobre a atividade osteoblástica. Estudos *in vitro* têm demonstrado que uma pequena quantidade de NO produzido constitutivamente por osteoblastos, ou a liberação lenta por doadores de NO, pode agir como um estimulador do crescimento e diferenciação de osteoblastos e da produção de citocinas (TURNER et al., 1997). Enquanto que concentração elevada de NO apresenta potente efeito inibitório sobre crescimento e diferenciação osteoblástica, que podem ser, em parte, devido a um efeito pró-apoptótico do NO (MANCINI et al., 2000). Investigações sobre o papel do NO como modulador do metabolismo de osteoblastos humanos *in vitro* mostraram que o NO quando liberado pelo 3-morfolino sidnonimina (SIN-1) tem efeito inibitório, dose-dependente, sobre a proliferação osteoblástica. Além disso, a inibição da NOS por L-NA, nessas culturas de células, aumentou a proliferação osteoblástica (DANZIGER; ZUCKERBRAUN; PENSLER, 1997).

Os efeitos do NO sobre a função celular óssea além de sofrer influência da concentração, parece ser dependente da via de produção. Estudos utilizando camundongos com inativação do gene da NOS mostram que o NO sintetizado via eNOS pode ser importante para a função osteoblástica normal, para a resposta anabólica do osso ao estrógeno exógeno e para a resposta do osso à cargas mecânicas e ao estresse de cisalhamento (CHAMBERS et al., 1999; ZAMAN et al., 1999; CHOW, 2000). Na presença de estrógeno, apenas a isoforma eNOS é expressa pelas células ósseas. Em contraste, o NO produzido via iNOS parece regular os efeitos de citocinas pró-inflamatórias sobre o osso e ser essencial para os efeitos estimulatórios destas sobre a reabsorção óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo* (VAN'T HOF et al., 2000). *In vitro*, o estrógeno bloqueia a síntese de NO via iNOS e estimula o aumento dos níveis de mRNA e da atividade da eNOS. Além disso, observa-se em camundongos ovariectomizados com inativação do gene da iNOS uma diminuição significativa da perda de massa óssea e do turnover ósseo induzidos pela deficiência estrogênica (CUZZOCREA et al., 2003). Os efeitos do NO produzido via nNOS sobre o metabolismo ósseo parece ter alguma importância, mas requer mais investigações (VAN'T HOF et al., 2004).

Todos os fatores citados acima apontam para possibilidade de que o NO derivado a partir da via eNOS disputa um importante papel em mediar os efeitos dos hormônios sexuais no osso. De acordo com essa hipótese, diversos estudos utilizando

nitroglicerina (NG) como doador de NO, demonstraram que este tratamento foi eficiente para a prevenção de perda óssea induzida por glicocorticóides em ratos Wistar (WIMALAWANSA et al., 1997), atenuou a perda óssea (WIMALAWANSA et al., 1996) e restaurou a massa óssea perdida decorrente de ovariectomia em ratas Sprague-Dawley (WIMALAWANSA, 2000c). Além disso, o tratamento com este doador de NO em pesquisa clínica mostrou-se tão eficiente quanto o estrógeno para a prevenção da perda óssea induzida pela deficiência estrogênica em mulheres ovariectomizadas. O uso de NG apresentou-se mais vantajoso do que o uso de estrógeno, uma vez que o tratamento a longo prazo (mais de um ano) não resultou em taquifilaxia e a dose de NG necessária foi muito baixa – 3 ou 4 vezes menor do que a dose geralmente usada para manter a homeostase cardiovascular (WIMALAWANSA, 2000a).

Alguns estudos sugerem que a L-arginina, por ser o substrato necessário para a síntese de NO, pode ser uma nova estratégia efetiva para a prevenção da osteoporose. Visser; Hoekman (1994), mostraram que a suplementação com este aminoácido aumenta a liberação basal de NO por células endoteliais, podendo inibir a reabsorção óssea e estimular a formação óssea por ativação do eixo GH - IGF-I. Fiore et al. (2000), sugerem que a administração de L-arginina previne a perda óssea causada pela ciclosporina A (droga implicada na patogênese de doenças ósseas pós-transplantes).

1.4 Avaliação Óssea Experimental

A quantidade e a qualidade óssea são igualmente importantes para manutenção da integridade esquelética ao longo da vida. Deste modo, o número de estudos focalizando a relação estrutura-resistência mecânica do tecido ósseo tem aumentado a cada dia (PENG et al., 1994). É geralmente aceito que as fraturas resultam de uma baixa quantidade de massa óssea (SCHÖNAU, 2004). Porém, a redução da resistência mecânica é a razão final para ocorrência de fraturas provenientes de um trauma mínimo (MELTON et al., 1986).

A mensuração da densidade mineral óssea (BMD) tem sido fortemente recomendada pela organização mundial de saúde como método quantitativo da massa óssea e como método avaliativo do risco de fraturas, tanto em diagnósticos clínicos quanto em avaliações experimentais (KANIS et al., 1994). A densitometria é hoje o exame preferencial para o diagnóstico da osteoporose e monitoramento da massa óssea, e é realizada,

principalmente, por técnica DEXA – absorciometria por raio X com duplo fóton (PINTO NETO et al., 2002). Contudo, discussões vigentes questionam o uso dos termos massa óssea e densidade óssea como sinônimos na literatura, e nos remete a precisão do cálculo da densidade óssea com base nos princípios de Arquimedes (chamada de “densidade física”) e ao conceito da mesma. Tem sido indicada também, a adição de outros métodos de avaliação a este parâmetro, para enriquecimento da avaliação e da definição de osteoporose, tanto na prática clínica, quanto em investigações científicas (SCHÖNAU, 2004).

Diversos testes biomecânicos têm sido utilizados para avaliar as propriedades mecânicas ósseas (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; LEPOLA et al., 1996; LIND et al., 2001). Dentre eles, o teste de flexão a três pontos em fêmur ou tíbia e o teste de compressão em vértebras são os mais utilizados (KIEBZAK et al., 1988; PENG et al., 1994; SØGAARD et al., 1994; KATSUMATA et al., 1995; SØGAARD et al., 1997). A partir dos dados de força e deformação obtidos no teste biomecânico, determinam-se diversos parâmetros relacionados à qualidade do tecido ósseo submetido ao ensaio. Isto ocorre devido à influência que a qualidade óssea exerce sobre a magnitude da força e da deformação gerada (EINHORN, 1996).

Os marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea também são utilizados. Eles identificam mudanças na remodelação óssea em curtos intervalos de tempo e são usados na monitorização do tratamento (ERIKSEN; BRIKEN; CHARLES, 1995; JUNQUEIRA; FONSECA; ALDRIGHI, 2001).

Outros métodos de avaliação óssea vem sendo utilizados experimentalmente com o intuito de inferir a integridade esquelética, além de enriquecer e melhorar a interpretação dos dados obtidos. Dentre eles, encontram-se a microscopia eletrônica de varredura – MEV (ZHOU; CHERNECKY; DAVIES, 1994), as medidas biométricas, a histomorfometria e os parâmetros físicos (MARTIN, 1990; NORDSLETTEN et al., 1994).

1.5 Objetivo

Investigar o efeito do óxido nítrico (NO) sobre a massa óssea trabecular e cortical de ratos orquiectomizados através de tratamentos com: o doador de NO dinitrato de isossorbida (ISDN), o inibidor da síntese de NO N^G-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME), e o precursor de NO L-Arginina (L-ARG).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

O presente estudo utilizou ratos Wistar, adultos, com quatro meses de idade e peso corpóreo médio inicial de 363 ± 16 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidos no Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia - DCF, com regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlada à $22 \pm 2^\circ$ C. Os animais foram alimentados com ração comercial (Primor - cálcio 1,5%, fósforo 0,4%, vitamina D₃ 1500 U.I./kg) e água *ad libitum*.

Ao término do experimento os animais foram sacrificados por decapitação. Os fêmures e as vértebras lombares foram retirados, dissecados e mantidos em salina a 0,9 % e a -20° C, até o momento inicial das análises.

2.2 Orquiectomia

Os ratos pertencentes aos grupos castrados foram submetidos à orquiectomia conforme técnica descrita por Zarrow et al. (1964), ao completarem quatro meses de idade. Após o sacrifício dos animais, a eficiência do processo de castração foi confirmada através da verificação da atrofia das glândulas seminais e prostáticas.

2.3 Tratamentos

Os tratamentos foram iniciados 24 horas após a castração, realizados uma vez ao dia, no período da manhã (entre 11 – 12 horas), seis dias por semana, durante oito (8) semanas. O tratamento dos animais intactos foi iniciado em período equivalente.

Tratamento com dinitrato de isossorbida (ISDN)

A dose utilizada foi de 10 mg/kg (KITA et al., 1994; LIN et al., 1998). A diluição da droga foi de 10 mg/2 ml de água destilada, com aplicação de 0,2 ml/100 g de PC por meio de gavagem (gv).

Tratamento com N^G-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME)

A dose utilizada foi de 25 mg/kg (MASCOLO et al., 1993; WIMALAWANSA et al., 1997; PRICKAERTS et al., 1998). A diluição da droga foi de 25 mg/1 ml de água destilada, sendo administrada por via subcutânea (sc) 0,1 ml/100 g de PC.

Tratamento com L-arginina (L-ARG)

A dose utilizada foi de 200 mg/kg (MOODY et al., 1997; SIKIRI et al., 1997). A diluição da droga foi de 200 mg/1 ml de água destilada, sendo administrada via intraperitoneal (ip) 0,1 ml/100 g de PC.

Tratamento com veículo

Os grupos intactos e castrados tratados com veículo receberam salina a 0,9%, administrada de maneira similar àquela do grupo tratado com droga do mesmo experimento.

2.4 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

EXPERIMENTO 1 – Efeito do tratamento com o doador de NO, ISDN, sobre fêmures e vértebras lombares de ratos orquiectomizados.

- Intactos tratados com salina – gv (INTA 1)
- Orquiectomizados tratados com salina - gv (ORX 1)
- Orquiectomizados tratados com ISDN - gv (ORX+ISDN)

EXPERIMENTO 2 – Efeito do tratamento com o inibidor da síntese de NO, L-NAME, sobre fêmures e vértebras lombares de ratos orquiectomizados.

- Intactos tratados com salina - sc (INTA 2)
- Orquiectomizados tratados com salina - sc (ORX 2)
- Orquiectomizados tratados com L-NAME - sc (ORX+L-NAME)

EXPERIMENTO 3 – Efeito do tratamento com o precursor de NO, L-Arginina, sobre fêmures e vértebras lombares de ratos orquiectomizados.

- Intactos tratados com salina - ip (INTA 3)
- Orquiectomizados tratados com salina - ip (ORX 3)
- Orquiectomizados tratados com L-Arginina - ip (ORX+L-ARG)

GRUPO BASAL - Animais intactos sacrificados aos quatro meses de idade (idade dos animais no início do experimento). A inclusão deste grupo se faz necessária para controle das variações decorrentes do crescimento corporal dos animais (KALU, 1991; MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993). Utilizou-se um grupo basal para os experimentos 1 e 2 (BASAL 1) e outro para o experimento 3 (BASAL 3) devido à diferença de PC inicial dos animais, existente entre os experimentos, e pelo fato do experimento 3 ter sido realizado separadamente.

2.5 Parâmetros Estudados:

2.5.1 Propriedades Biométricas

Peso Corporal

Durante o período de tratamento (8 semanas), os valores de peso corporais foram verificados semanalmente, para correção do volume da droga ou do veículo a ser administrado, bem como para o monitoramento da saúde e crescimento dos animais.

Comprimento do Fêmur

Após serem dissecados de suas partes moles, os fêmures esquerdos tiveram seus comprimentos medidos por meio de um paquímetro, no momento imediatamente anterior à realização do corte transversal da diáfise (descrito a seguir).

Diâmetros da Diáfise e Espessura das paredes do Fêmur Esquerdo

Foram medidos os diâmetros da diáfise do fêmur esquerdo bem como as espessuras das paredes ósseas nos eixos látero-medial e ântero-posterior. Para isso, as diáfises foram seccionadas em cortes transversais logo abaixo do trocanter menor, utilizando-se um motor de suspensão (Modelo MINI – 90 W – BELTEC). As secções transversas foram observadas na posição proximal – distal, em lupa acoplada a um microscópio ZEISS-STEMI SV6 com aumento igual a 1,0 – 0,100mm/traço, para determinar as medidas maiores e menores dos diâmetros externos e internos dos ossos, e as medidas das espessuras das paredes ósseas (Figura 3). Assim sendo, todas essas medidas foram realizadas nas superfícies proximais do anel femoral de cada animal experimental.

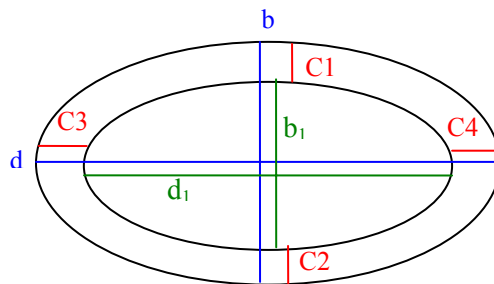


Figura 3: Esquema da obtenção das medidas de diâmetro externo menor e maior, e de diâmetro interno menor e maior da diáfise femoral, realizadas em secção transversa de fêmures esquerdos de ratos, utilizando-se lupa acoplada a um microscópio, para obtenção da espessura das paredes ósseas. Onde: **b** = diâmetro externo menor; **d** = diâmetro externo maior; **b₁** = diâmetro interno menor; **d₁** = diâmetro interno maior; **C1** = espessura da parede anterior; **C2** = espessura da parede posterior; **C3** = espessura da parede lateral; **C4** = espessura da parede medial.

Também foi analisado:

Momento de Inércia (SEDLIN; HIRSCH, 1966; KIEBZAK et al., 1988)

$$I = \frac{1}{64} \pi (bd^3 - b_1d_1^3)$$

Onde:

I = momento de inércia (mm^4)

b = diâmetro externo menor (mm)

d = diâmetro externo maior (mm)

b_1 = diâmetro interno menor (mm)

d_1 = diâmetro interno maior (mm)

2.5.2 Propriedades Biomecânicas do Fêmur Direito e do Corpo Vertebral da Quinta Vértebra Lombar

Os parâmetros biomecânicos foram obtidos a partir de ensaio mecânico de flexão a três pontos realizado no fêmur direito e de teste mecânico de compressão óssea realizado no corpo vertebral da quinta vértebra lombar (VL5). Os testes foram realizados em uma máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, utilizando-se uma célula de carga com capacidade máxima de 100 kgf (aproximadamente 1 KN).

Fêmur Direito:

Doze horas antes do ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento antecedente ao teste (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG et al., 1994). As extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes, com diâmetro de 3,0 mm, suportados por apoios distanciados de 21,7 mm. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido póstero-anterior, no ponto médio entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com um rolete de 3,0 mm fixado em sua extremidade, a uma velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da ruptura do osso. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidas as curvas força-deformação para os diversos ensaios e determinados os parâmetros biomecânicos mencionados abaixo (Figura 4).

Força no limite elástico (N)

Corresponde à força determinada a partir do ponto sobre a curva força-deformação que separa a fase elástica da fase plástica (F_1). Para o tecido ósseo, a fase elástica

corresponde à porção linear da curva e a fase plástica a parte não linear da mesma (EINHORN, 1996). O ponto de junção das duas regiões corresponde ao limite elástico (A) e foi determinado através da reta (R) obtida por análise de regressão linear.

Força máxima (N)

Corresponde à maior força aplicada durante o ensaio, também conhecida como última força (F_2).

Força de ruptura (N)

Corresponde à força registrada no momento de ruptura do osso (F_3).

Deformações (mm)

Deformação do fêmur correspondente à distância movida pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento referentes às forças: no limite elástico, no ponto de força máxima e de ruptura (D_1 , D_2 e D_3 , respectivamente).

Rigidez (dF/dx) (N/mm)

Determinada através da inclinação da reta (R) ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica (SØGAARD et al., 1994).

Resiliência (mJ)

Corresponde à área sob a curva força-deformação até o limite elástico (A), obtida através de integração numérica.

Capacidade de absorção de energia (mJ)

Corresponde a área sob a curva força-deformação até o ponto de força máxima (B), obtida através de integração numérica.

Tenacidade (mJ)

Corresponde a área sob a curva força-deformação até o ponto de ruptura óssea (C), obtida através de integração numérica.

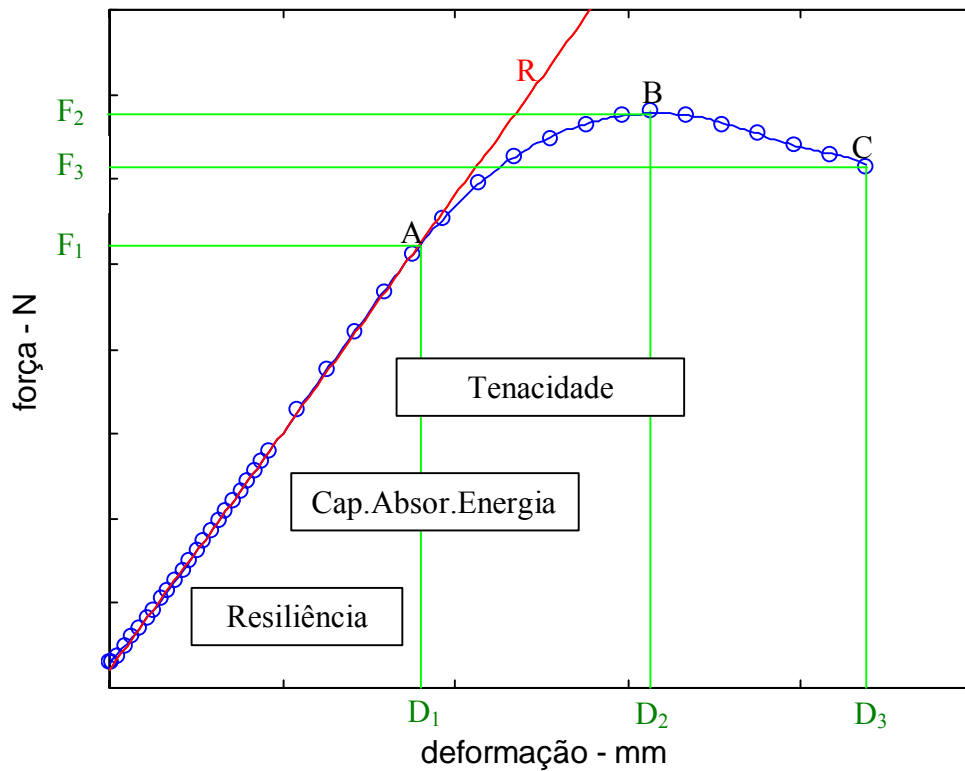


Figura 4: Curva força-deformação mostrando os diversos parâmetros biomecânicos: F₁, força no limite elástico; D₁, deformação no limite elástico; F₂, força máxima; D₂, deformação no ponto de força máxima; F₃, força de ruptura; D₃, deformação no ponto de ruptura (deformação máxima); A, limite elástico; B, ponto de força máxima; C, ponto de ruptura; R, reta ajustada à fase elástica (rigidez (dF/dx) = inclinação de R (N/mm)).

Momento Máximo

$$M = \frac{FL}{4}$$

onde:

M – momento máximo (N.mm)

F – força máxima (N)

L – distância dos apoios (mm)

Corpo Vertebral da Quinta Vértebra Lombar:

Doze horas antes da realização dos ensaios, as vértebras lombares foram descongeladas à temperatura ambiente, a vértebra L5 foi separada das demais e seu corpo foi isolado a partir da remoção do processo espinhoso, dos processos transversos e do arco vertebral. As extremidades do corpo vertebral foram minimamente lixadas para obtenção de superfícies planas. A força foi aplicada no sentido craniocaudal a uma velocidade constante de 2 mm/min, até a compressão de 2/3 (dois terços) de cada amostra. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidas as curvas força-deformação e os seguintes parâmetros biomecânicos dos corpos vertebrais: força no limite elástico, deformação no limite elástico, rigidez, capacidade de absorver energia, força máxima, deformação máxima e tenacidade.

2.5.3 Densitometria Óssea do Fêmur Esquerdo e da Sexta Vértebra Lombar

A densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo e da sexta vértebra lombar (VL6) foi mensurada por densitometria de duplo fóton (DEXA), em equipamento pDEXA®SABREtm X-Ray BONE DENSITOMETER (Norland Medical System, INC., Fort Atkinson, WI, USA), pertencente ao Laboratório de Estrutura e Função Celular – ICB III da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo. Este procedimento foi realizado através de um sistema de parceria entre os departamentos das respectivas universidades.

No momento da realização desta análise, os ossos se encontravam isolados e desprovidos de tecidos moles.

2.5.4 Propriedades Físicas do Corpo Vertebral

Imediatamente antes da realização do teste de compressão, foram medidos a altura, o peso imerso (P_i) e o peso úmido (P_u) dos corpos vertebrais. Após o teste de compressão, os corpos das vértebras foram desidratados em uma estufa (marca Funbec) a 100°C durante 24 horas, para, em seguida, mensurar-se o peso seco (P_s). Para a obtenção do material mineral, os ossos foram incinerados em uma mufla a 800°C durante 24 horas, dos quais, também, verificou-se o peso (P_m) (NORDSLETTEN et al., 1994). Para tais mensurações foram utilizados um paquímetro e uma balança eletrônica (marca Chyo).

A densidade óssea e mineral dos referidos ossos, bem como os respectivos percentuais ósseos, foram obtidos a partir do cálculo do volume ósseo, que segue o Princípio de Arquimedes, conforme as seguintes fórmulas (MARTIN, 1990):

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

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

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

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

$$\text{Percentual de Material Orgânico} = \frac{P_s - P_m}{P_u} 100 \quad (\%)$$

$$\text{Percentual de Material Mineral} = \frac{P_m}{P_u} 100 \quad (\%)$$

Onde:

P_u – Peso do Osso Úmido (g)

P_i – Peso do Osso Imerso (g)

P_s – Peso Ósseo da Amostra Desidratada (g)

Pm – Peso do Material Mineral – Cinzas (g)

ρ – Densidade da Água (g/cm^3)

A área de secção transversa do corpo vertebral foi calculada dividindo-se o volume pela altura de cada espécime (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; KATSUMATA et al., 1995; SØGAARD et al., 1997).

2.5.5 Análise da Superfície Óssea Trabecular Femoral por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise da superfície óssea trabecular dos animais, foi realizada nas epífises distais dos fêmures esquerdos, por meio de MEV. Os espécimes foram mergulhados em nitrogênio líquido durante dois minutos para realização da criofratura. A fratura foi feita apoiando-se um bisturi entre os côndilos femorais, no plano sagital, com auxílio de um martelo. Em seguida, as amostras foram submersas em álcool absoluto.

Após a criofratura de todas de todos os ossos, as amostras foram mantidas em estufa à 50°C por 3 horas; *fixadas* em solução glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, por duas horas a 4°C ; *lavadas* em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por três vezes durante 10 minutos cada uma, e em água destilada durante dois minutos; *desidratadas* em soluções com percentuais crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90%, 95%) e álcool etílico absoluto, permanecendo durante dez minutos em cada concentração e por duas vezes no álcool etílico absoluto; *secas* em HMDS (1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane) 98% por duas vezes, durante o tempo de trinta segundos cada uma.

Após a preparação, as amostras foram coladas em porta-amostras de alumínio, com uma tinta à base de prata para facilitar o fluxo dos elétrons e foram recobertas com uma fina camada de ouro (Sputter Coater – Balzers ISCD004, Bal-Tec), tornando-as condutoras e, portanto, preparadas para serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura. Para a observação qualitativa da conectividade entre as trabéculas e as alterações de arquitetura trabecular foram utilizados aumentos de 40, 50 e 100 vezes (CLARK, 1991; ZHOU; CHERNECKY; DAVIES, 1994; BERTONCELLO, 2001). O microscópio eletrônico de varredura utilizado (Zeiss, modelo DSM 940A) pertence ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da UFSCar.

2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos em cada grupo foram comparados entre si, para cada parâmetro analisado, através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, adotando um nível de significância de $p < 0,05$. A probabilidade do teste, obtida em cada comparação, encontra-se no apêndice. Os parâmetros de cada grupo experimental são apresentados em tabelas e gráficos através de seus valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM).

2.7 Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho

O presente trabalho foi elaborado e normalizado segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Das normas que estão em vigência foram utilizadas:

- NBR 6023/ago. 2002 para referências;
- NBR 6024/mai. 2003 para numeração progressiva;
- NBR 6027/mai. 2003 para sumário;
- NBR 10520/ago. 2002 para citações;
- NBR 14724/dez. 2005 para trabalhos acadêmicos.

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

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1

Efeitos do tratamento com o doador de NO, ISDN, sobre fêmures e vértebras lombares de ratos orquiectomizados.

3.1.1 Propriedades Biométricas

Os valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) do peso corporal inicial e final, e do ganho de peso corporal, dos quatro grupos de animais que compõem este experimento são mostrados na Tabela 1 e na Figura 5. Pode-se observar que, não houve diferença estatística com relação aos pesos corporais inicial e final entre os diversos grupos experimentais e que o ganho de peso do grupo ORX 1 foi significativamente menor quando comparado ao do grupo INTA 1. Observou-se também, que o ganho de peso do grupo ORX+ISDN não diferiu daquele apresentado pelo grupo INTA 1.

Tabela 1: Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 1	ORX 1	ORX+ISDN
n	9	12	7	7
PC inicial (g)	359,9 \pm 9,52	357,3 \pm 7,04	365,1 \pm 4,67	360,9 \pm 14,77
PC final (g)	-	395,2 \pm 8,61	387,3 \pm 3,96	398,1 \pm 14,40
Ganho de PC (g)	-	37,83 \pm 3,14	22,14 \pm 4,00 ⁱ	37,29 \pm 5,96

ⁱ p<0,05 vs INTA 1. PC, peso corporal; BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

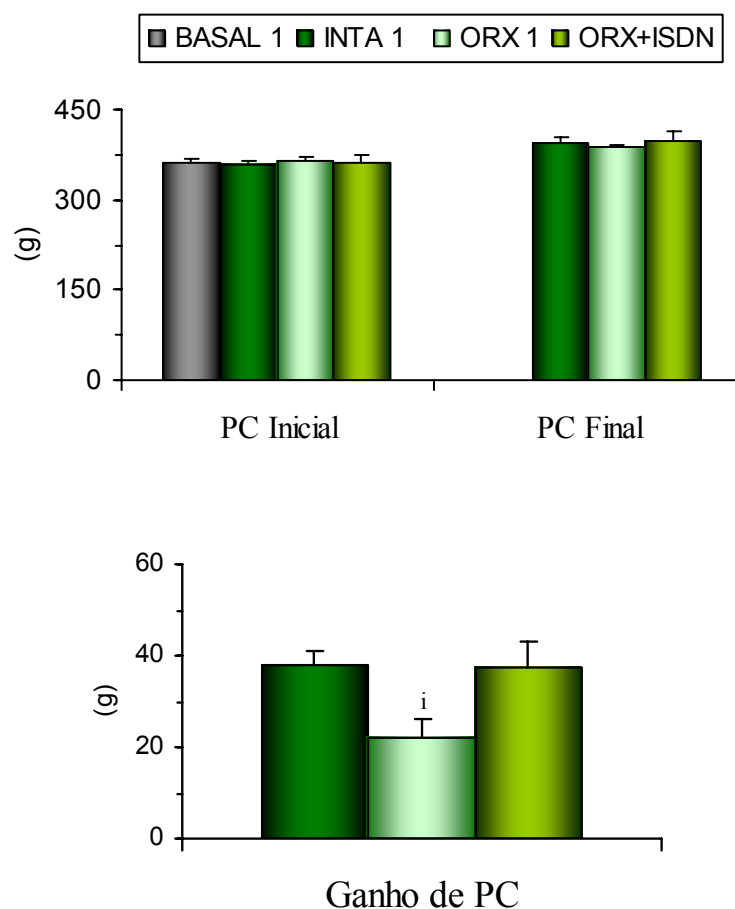


Figura 5: Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos que compõem o experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. ⁱ $p < 0,05$ vs INTA 1. PC, peso corporal; BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

Os valores referentes aos parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos dos ratos dos diferentes grupos, referentes ao experimento 1, são encontrados na Tabela 2 e nas Figuras 6 e 7. Os valores são expressos em Média \pm EPM.

Verificou-se que os grupos: INTA 1, ORX 1 e ORX+ISDN, quando comparados ao grupo BASAL 1 apresentaram um aumento significativo do comprimento ósseo, dos diâmetros da diáfise femoral, da espessura de algumas paredes ósseas e do momento de inércia. O grupo ORX 1, quando comparado ao grupo INTA 1, mostrou um aumento significativo dos diâmetros internos maior e menor, além de uma diminuição significativa da espessura das paredes medial e posterior. O grupo ORX+ISDN diferiu estatisticamente do grupo INTA 1 apenas com relação a espessura da parede posterior da diáfise femoral, não apresentando diferenças significativas relativas aos demais parâmetros.

Tabela 2: Parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média ± EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 1	ORX 1	ORX+ISDN
n	9	12	7	7
L(mm)	37,86 ± 0,29	39,49 ± 0,35 ^b	39,24 ± 0,28 ^b	39,06 ± 0,36 ^b
Diâm. Externo > (mm)	4,32 ± 0,06	4,71 ± 0,07 ^b	4,87 ± 0,10 ^b	4,87 ± 0,07 ^b
Diâm. Externo < (mm)	3,00 ± 0,05	3,20 ± 0,04 ^b	3,23 ± 0,06 ^b	3,14 ± 0,05
Diâm. Interno > (mm)	2,46 ± 0,05	2,60 ± 0,04	2,91 ± 0,06 ^{bi}	2,83 ± 0,16 ^b
Diâm. Interno < (mm)	1,59 ± 0,04	1,78 ± 0,04 ^b	1,99 ± 0,05 ^{bi}	1,81 ± 0,06 ^b
Espes. parede lat. (mm)	1,23 ± 0,06	1,39 ± 0,03 ^b	1,34 ± 0,12	1,34 ± 0,09
Espes. parede med. (mm)	0,63 ± 0,02	0,72 ± 0,03 ^b	0,61 ± 0,01 ⁱ	0,70 ± 0,02 ^x
Espes. parede ant. (mm)	0,66 ± 0,02	0,68 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,66 ± 0,02
Espes. parede post. (mm)	0,76 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,63 ± 0,03 ^{bi}	0,67 ± 0,02 ^{bi}
Mom. de inércia (mm ⁴)	10,83 ± 0,63	14,96 ± 0,92 ^b	16,06 ± 1,33 ^b	15,75 ± 0,66 ^b

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

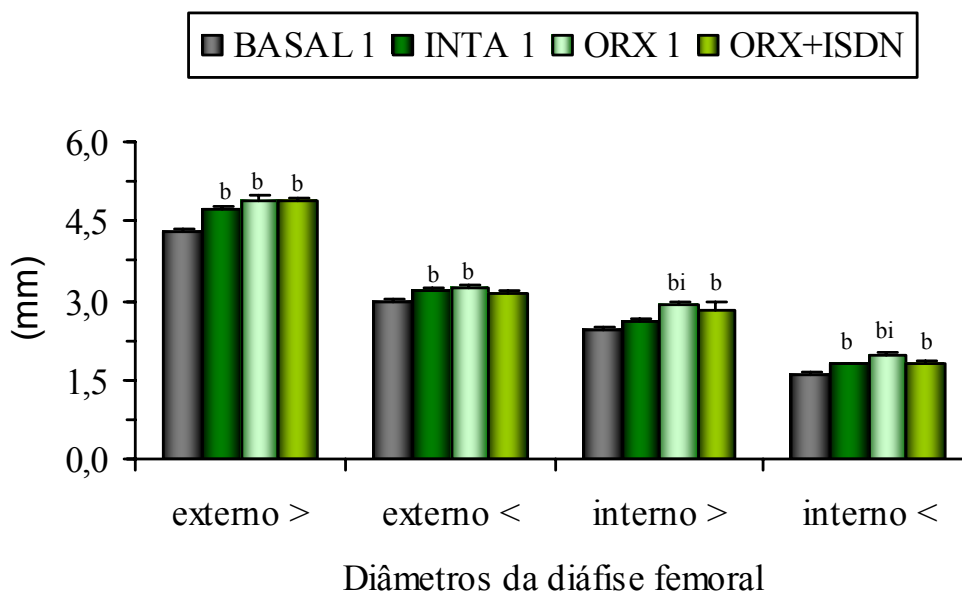


Figura 6: Diâmetros externos maior e menor, e diâmetros internos maior e menor da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

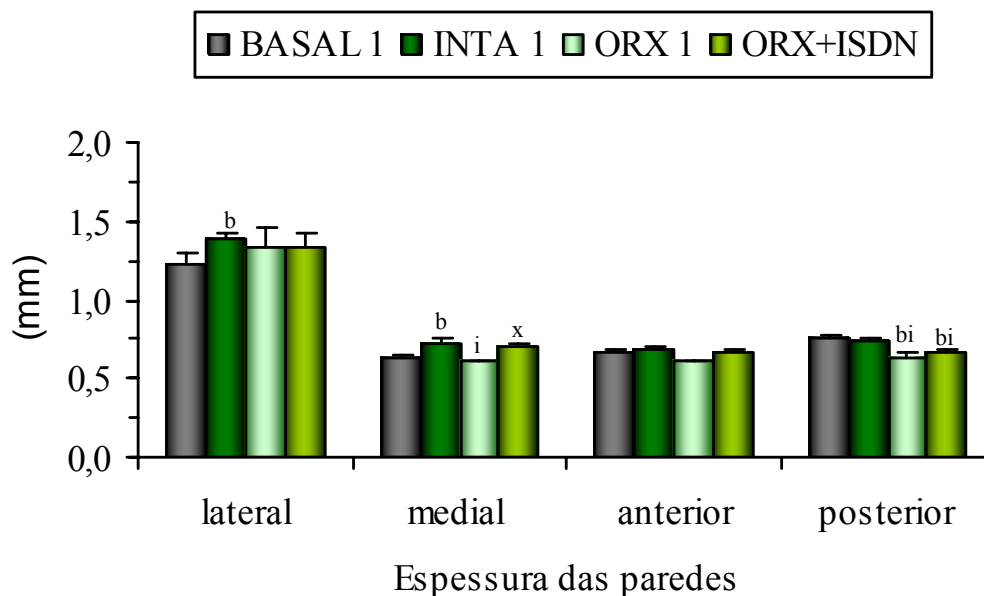


Figura 7: Espessuras das paredes lateral, medial, anterior e posterior da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 1. Encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

3.1.2 Propriedades Biomecânicas

Os valores referentes aos parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos ratos dos diferentes grupos do experimento 1, obtidos a partir de ensaio mecânico de flexão a três pontos, estão apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 8 e 9. Os valores médios são apresentados juntamente com o EPM de cada grupo experimental.

O grupo INTA 1, quando comparado ao grupo BASAL 1, mostrou um aumento significativo dos parâmetros: força no limite elástico, rigidez, força máxima, capacidade de absorver energia, força de ruptura, tenacidade e momento máximo. O grupo ORX 1, quando comparado ao grupo BASAL 1, apresentou força máxima, capacidade de absorver energia, tenacidade e momento máximo estatisticamente maiores, e deformação no limite elástico estatisticamente menor. Quando comparado ao grupo INTA 1, o grupo ORX 1 expressou valores significativamente menores de: força no limite elástico, deformação no limite elástico, resiliência, força máxima, força de ruptura e momento máximo; além de expressar valor significativamente maior de deformação no ponto de ruptura. O grupo

ORX+ISDN quando comparado ao grupo BASAL 1, obteve aumento significativo de: força máxima, capacidade de absorver energia, força de ruptura, tenacidade e momento máximo. Quando comparado ao grupo INTA 1, o grupo ORX+ISDN se mostrou estatisticamente igual em todos os parâmetros estudados. Em relação ao grupo ORX 1, o grupo ORX+ISDN exibiu valores significativamente maiores de deformação no limite elástico e de força de ruptura.

Tabela 3: Parâmetros biomecânicos do fêmur direito de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos através do teste de flexão a três pontos. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 1	ORX 1	ORX+ISDN
n	9	12	7	7
Força limite elástico (N)	78,89 \pm 2,17	99,95 \pm 4,93 ^b	81,07 \pm 5,68 ⁱ	93,18 \pm 6,79
Deform.limit.elást. (mm)	0,44 \pm 0,04	0,43 \pm 0,03	0,33 \pm 0,01 ^{bi}	0,44 \pm 0,03 ^x
Rigidez (N/mm)	199,7 \pm 9,24	263,3 \pm 14,09 ^b	220,0 \pm 10,53	233,4 \pm 13,19
Resiliência (mJ)	16,84 \pm 0,95	20,42 \pm 1,70	14,84 \pm 1,42 ⁱ	20,11 \pm 1,89
Força máxima (N)	100,5 \pm 2,64	136,4 \pm 4,68 ^b	115,0 \pm 4,81 ^{bi}	127,4 \pm 4,19 ^b
Deform.Forç.máx. (mm)	0,73 \pm 0,03	0,79 \pm 0,04	0,82 \pm 0,06	0,76 \pm 0,04
Capac.absor.energia (mJ)	44,16 \pm 2,84	64,89 \pm 3,43 ^b	62,87 \pm 3,58 ^b	55,96 \pm 3,64 ^b
Força de ruptura (N)	79,56 \pm 5,10	120,6 \pm 5,54 ^b	82,06 \pm 6,66 ⁱ	103,1 \pm 6,27 ^{bx}
Deform. ruptura (mm)	1,14 \pm 0,06	1,06 \pm 0,03	1,36 \pm 0,13 ⁱ	1,15 \pm 0,09
Tenacidade (mJ)	79,76 \pm 4,13	98,42 \pm 5,31 ^b	115,1 \pm 7,74 ^b	100,9 \pm 8,56 ^b
Momento máx. (N.mm)	545,2 \pm 14,30	739,9 \pm 25,40 ^b	623,8 \pm 26,09 ^{bi}	691,3 \pm 22,72 ^b

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv). Deform. limit. elást., deformação no limite elástico; Deform.Forç.máx., deformação no ponto de força máxima; Capac. absor. energia, capacidade de absorver energia; Deform. ruptura, deformação no ponto de ruptura; máx., máximo (a).

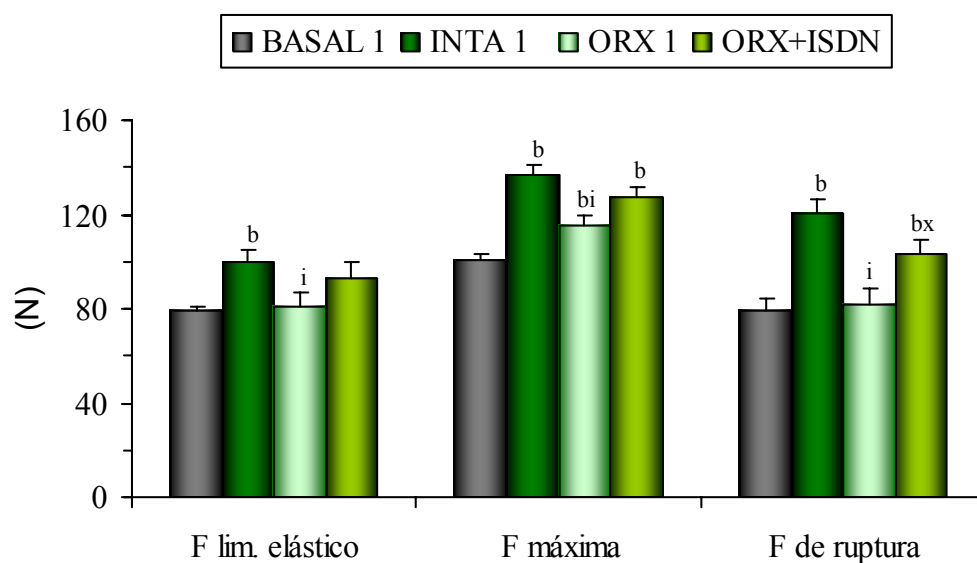


Figura 8: Valores de forças aplicadas ao fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos. A força no limite elástico (F lim. elástico), a força máxima aplicada (F máxima) e a força no ponto de ruptura (F de ruptura) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

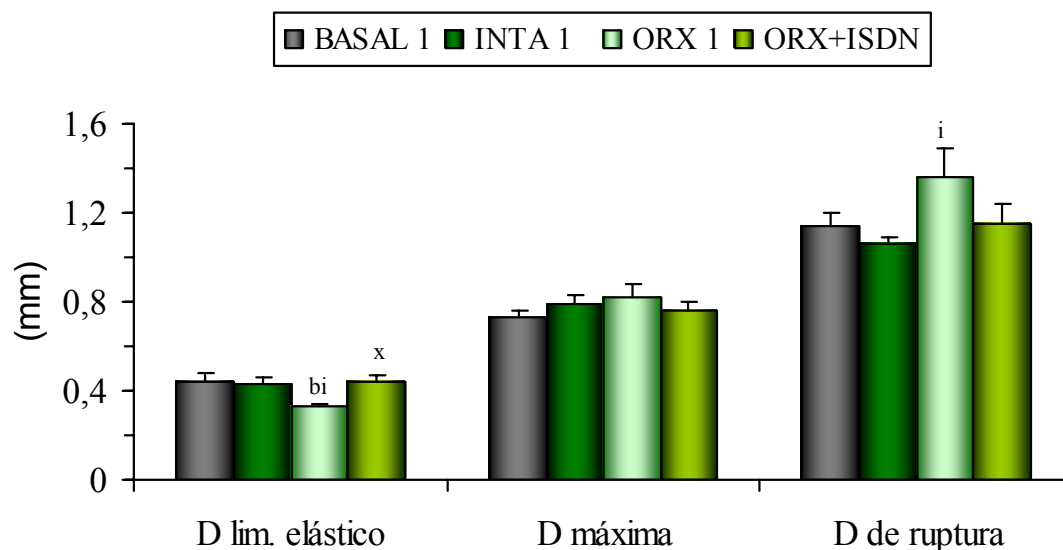


Figura 9: Deformações do fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos. A deformação no limite elástico (D lim. elástico), a deformação no ponto de força máxima (D máxima) e a deformação no ponto de ruptura (D de ruptura) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

Os valores referentes aos parâmetros biomecânicos, obtidos a partir de teste de compressão dos corpos vertebrais da quinta vértebra lombar, de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 1, encontram-se apresentados na Tabela 4 e nas Figuras 10 e 11. Os valores médios são mostrados juntamente com o EPM de cada grupo experimental.

Observou-se que o grupo INTA 1 apresentou um aumento significativo da força no limite elástico, da capacidade de absorver energia e da tenacidade, quando comparado ao grupo BASAL 1. O grupo ORX 1 expressou uma rigidez estatisticamente menor do que os grupos BASAL 1 e INTA 1, além de força no limite elástico, força máxima e tenacidade significativamente menores do que o grupo INTA 1. O grupo ORX+ISDN obteve deformação no ponto de força máxima estatisticamente menor do que o grupo BASAL 1, e apresentou valores significativamente menores dos parâmetros: força no limite elástico, capacidade de absorver energia, força máxima e tenacidade, quando comparado ao grupo INTA 1. Com relação ao grupo ORX 1, o grupo ORX+ISDN não apresentou diferenças estatísticas.

Tabela 4: Parâmetros biomecânicos dos corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos a partir de teste de compressão. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 1	ORX 1	ORX+ISDN
n	9	12	7	7
Força limite elástico (N)	129,3 \pm 6,97	187,2 \pm 6,02 ^b	129,5 \pm 15,38 ⁱ	147,4 \pm 9,26 ⁱ
Deform. limite elást. (mm)	0,38 \pm 0,06	0,47 \pm 0,04	0,49 \pm 0,08	0,40 \pm 0,04
Rigidez (N/mm)	740,9 \pm 110,3	633,4 \pm 35,36	405,5 \pm 43,86 ^{bi}	575,8 \pm 62,82
Capac. absorv. energ. (mJ)	32,50 \pm 7,19	55,26 \pm 5,18 ^b	43,20 \pm 11,08	36,01 \pm 2,71 ⁱ
Força Máxima (N)	169,7 \pm 11,20	195,5 \pm 8,35	133,7 \pm 13,56 ⁱ	149,5 \pm 9,38 ⁱ
Deformação Máx. (mm)	2,90 \pm 0,35	1,31 \pm 0,41	0,93 \pm 0,40	0,76 \pm 0,37 ^b
Tenacidade (Mpa)	0,08 \pm 0,00	0,10 \pm 0,01 ^b	0,07 \pm 0,01 ⁱ	0,08 \pm 0,01 ⁱ

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

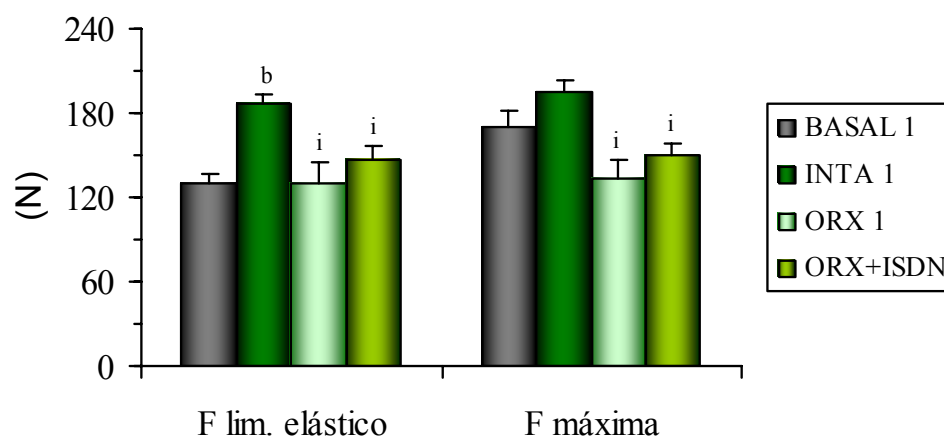


Figura 10: Valores de forças aplicadas ao corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos que compõem o experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão. A força no limite elástico (F lim. elástico) e a força máxima aplicada (F máxima) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

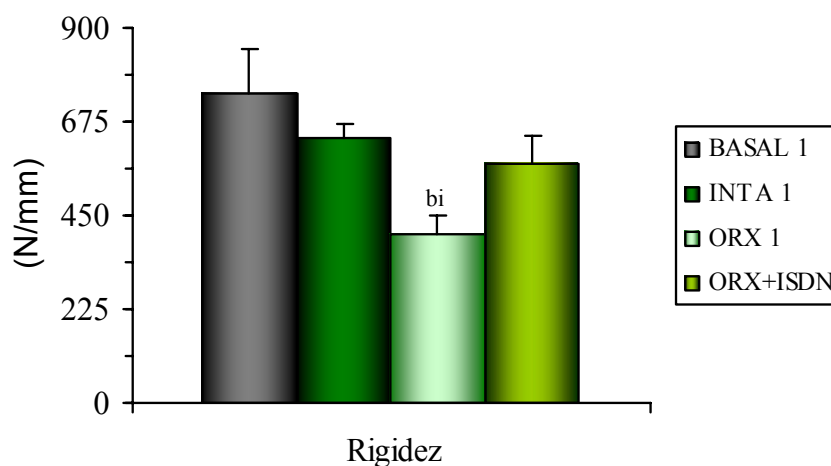


Figura 11: Valores de rigidez do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

3.1.3 Densitometria Óssea do Fêmur Esquerdo e da Sexta Vértebra Lombar

Os valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD), do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6), de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 1, obtidas através de densitometria de duplo fóton, podem ser observadas na Tabela 5 e na Figura 12.

Verificou-se que no FE, apenas as BAs dos terços proximal e distal foram estatisticamente iguais entre os grupos INTA 1 e BASAL 1, e que todos os demais parâmetros densitométricos do grupo INTA 1 foram estatisticamente maiores do que os do grupo BASAL 1. O grupo ORX 1, quando comparado ao grupo BASAL 1, apresentou aumento significativo dos parâmetros: BMC e BA do FE total; BMC, BA e BMD do terço médio do FE; e BMC e BA do terço proximal do FE. Quando comparado ao grupo INTA 1, o grupo ORX 1 mostrou uma redução significativa da BMD do FE total e de cada um de seus três terços, além de um aumento significativo da BA do terço médio do fêmur. O grupo ORX+ISDN, quando comparado ao grupo BASAL 1, expressou um aumento significativo dos valores médios de: BMC e BMD do FE total; BMC e BMD do terço distal do FE; BMC, BA e BMD do terço médio do FE; BMC e BMD do terço proximal do FE. Quando comparado ao grupo INTA 1, o grupo ORX+ISDN apresentou diminuição significativa apenas da BMD do terço proximal do FE e não foi estatisticamente diferente em relação aos demais parâmetros densitométricos. Em relação ao grupo ORX 1, o grupo ORX+ISDN apresentou valores médios estatisticamente maiores de: BMD do FE total, BMC e BMD do terço distal e BMD do terço médio; sendo estatisticamente igual quanto aos parâmetros analisados no terço proximal do FE.

Na análise da VL6, observou-se que o grupo INTA 1 evidenciou valores médios estatisticamente maiores, em todos os parâmetros estudados, quando comparado ao grupo BASAL 1. O grupo ORX 1 mostrou BMC e BA estatisticamente maiores do que os do grupo BASAL 1, porém, BMC e BMD significativamente menores do que os do grupo INTA 1. O grupo ORX+ISDN apresentou aumento significativo de todos os parâmetros estudados quando comparado ao grupo BASAL 1, mostrou diminuição significativa de BMD quando comparado ao grupo INTA 1, e não apresentou diferenças estatísticas com relação ao grupo ORX 1.

Tabela 5: Valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 1	ORX 1	ORX+ISDN
n	9	12	7	7
BMC (g) FE total	0,36 \pm 0,012	0,45 \pm 0,011 ^b	0,41 \pm 0,010 ^b	0,43 \pm 0,012 ^b
BA (cm ²) FE total	2,40 \pm 0,050	2,55 \pm 0,042 ^b	2,62 \pm 0,034 ^b	2,54 \pm 0,045
BMD (g/cm ²) FE total	0,15 \pm 0,002	0,17 \pm 0,002 ^b	0,16 \pm 0,003 ⁱ	0,17 \pm 0,003 ^{bx}
BMC (g) 1/3 distal FE	0,13 \pm 0,003	0,15 \pm 0,004 ^b	0,14 \pm 0,004	0,15 \pm 0,003 ^{bx}
BA (cm ²) 1/3 distal FE	0,86 \pm 0,016	0,89 \pm 0,016	0,90 \pm 0,015	0,88 \pm 0,011
BMD(g/cm ²) 1/3 distal FE	0,15 \pm 0,001	0,17 \pm 0,002 ^b	0,15 \pm 0,003 ⁱ	0,17 \pm 0,002 ^{bx}
BMC (g) 1/3 médio FE	0,10 \pm 0,004	0,13 \pm 0,003 ^b	0,12 \pm 0,003 ^b	0,13 \pm 0,004 ^b
BA (cm ²) 1/3 médio FE	0,67 \pm 0,014	0,74 \pm 0,009 ^b	0,77 \pm 0,009 ^{bi}	0,74 \pm 0,014 ^b
BMD(g/cm ²)1/3 médio FE	0,15 \pm 0,003	0,17 \pm 0,003 ^b	0,16 \pm 0,003 ^{bi}	0,17 \pm 0,004 ^{bx}
BMC (g) 1/3 prox. FE	0,13 \pm 0,005	0,17 \pm 0,005 ^b	0,15 \pm 0,003 ^b	0,16 \pm 0,005 ^b
BA (cm ²) 1/3 prox. FE	0,86 \pm 0,021	0,92 \pm 0,017	0,95 \pm 0,013 ^b	0,92 \pm 0,021
BMD(g/cm ²) 1/3 prox. FE	0,16 \pm 0,003	0,18 \pm 0,002 ^b	0,16 \pm 0,003 ⁱ	0,17 \pm 0,003 ^{bi}
BMC (g) VL6	0,084 \pm 0,004	0,114 \pm 0,004 ^b	0,098 \pm 0,003 ^{bi}	0,100 \pm 0,004 ^b
BA (cm ²) VL6	0,98 \pm 0,023	1,14 \pm 0,026 ^b	1,08 \pm 0,021 ^b	1,09 \pm 0,032 ^b
BMD (g/cm ²) VL6	0,086 \pm 0,002	0,099 \pm 0,002 ^b	0,090 \pm 0,002 ⁱ	0,091 \pm 0,001 ^{bi}

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

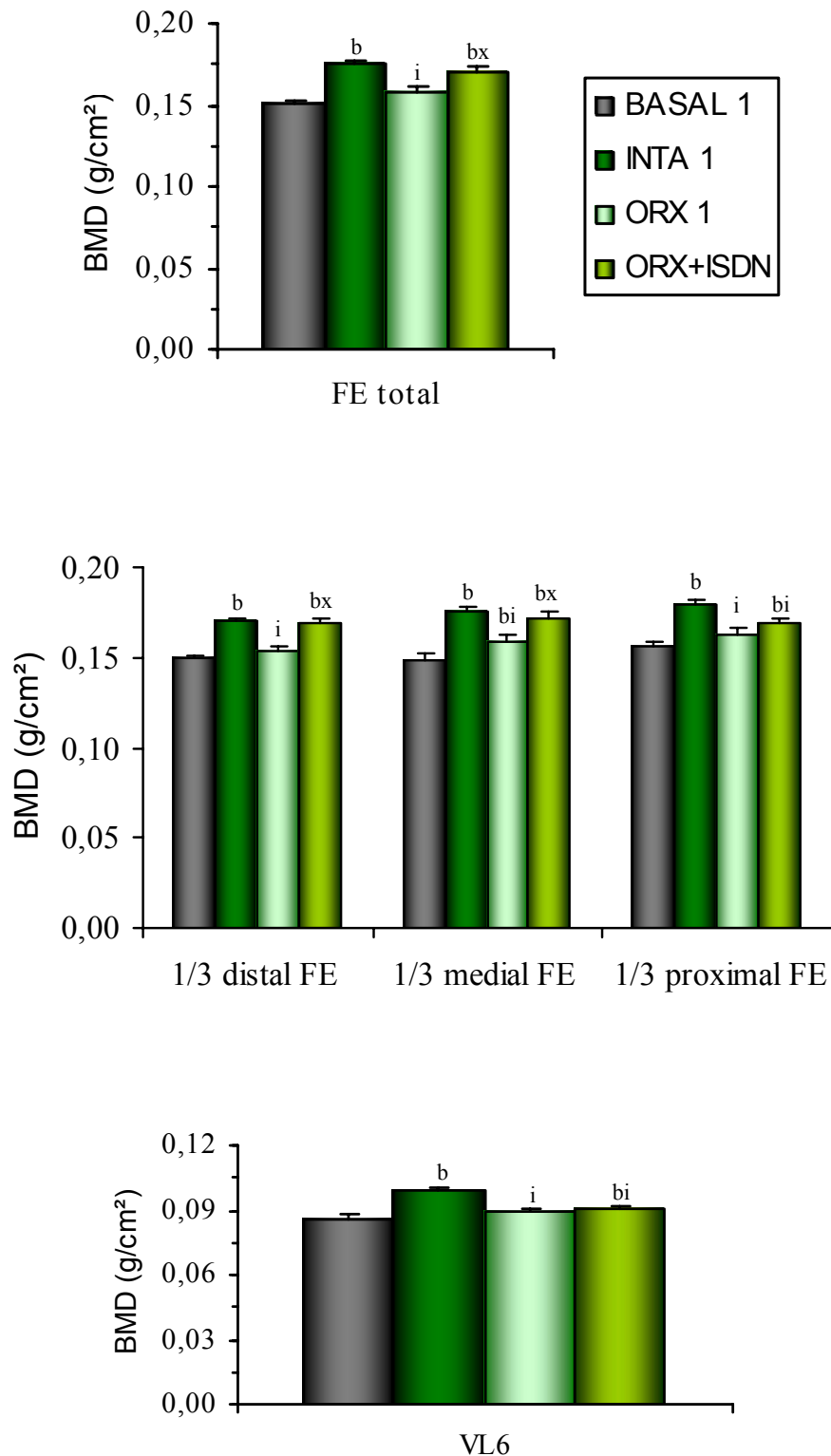


Figura 12: Valores de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 1, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

3.1.4 Propriedades Físicas do Corpo Vertebral da Quinta Vértebra Lombar

Os valores médios dos parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar (VL5), de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 1, estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 12.

Os parâmetros físicos do corpo vertebral do grupo INTA 1, quando comparados aos do grupo BASAL 1, mostraram um aumento significativo de: altura, peso imerso, peso úmido, peso seco, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral óssea e do percentual ósseo de material mineral; além de uma diminuição significativa do percentual ósseo de água. No grupo ORX 1, os parâmetros: altura, peso imerso, peso úmido, peso seco, peso das cinzas, volume ósseo, percentual ósseo de água e área de secção transversa, foram estatisticamente maiores do que no grupo BASAL 1; enquanto os parâmetros: densidade óssea, densidade mineral óssea e percentual ósseo de material orgânico, foram estatisticamente menores. Quando comparado ao grupo INTA 1, o grupo ORX 1 apresentou aumento significativo dos parâmetros: peso do osso úmido, volume ósseo, percentual ósseo de água e área de secção transversa; além de diminuição significativa dos parâmetros: densidade óssea, densidade mineral e dos percentuais ósseos de material orgânico e de material mineral.

O grupo ORX+ISDN, quando comparado ao grupo BASAL 1, mostrou um aumento significativo dos parâmetros: altura, peso imerso, peso úmido, peso seco, peso das cinzas, volume ósseo e área de secção transversa; apresentou diminuição significativa do percentual de material orgânico; não sendo estatisticamente diferente com relação aos demais parâmetros. Com relação aos parâmetros volume ósseo e percentual ósseo de água observou-se que o grupo ORX+ISDN, embora tenha apresentado um aumento significativo comparado ao grupo INTA 1, apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo ORX 1. Por outro lado, observando-se os parâmetros: densidade óssea, densidade mineral óssea, percentual ósseo de material orgânico e percentual ósseo de material mineral notou-se que o grupo ORX+ISDN foi estatisticamente menor do que o grupo INTA 1, mas foi estatisticamente maior do que o grupo ORX 1.

Tabela 6: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 1	ORX 1	ORX+ISDN
n	9	12	7	7
Altura (mm)	6,28 \pm 0,15	7,05 \pm 0,13 ^b	7,41 \pm 0,15 ^b	7,04 \pm 0,10 ^b
Peso do osso imerso (g)	0,02 \pm 0,001	0,03 \pm 0,001 ^b	0,03 \pm 0,002 ^b	0,03 \pm 0,001 ^b
Peso do osso úmido (g)	0,10 \pm 0,005	0,11 \pm 0,003 ^b	0,14 \pm 0,004 ^{bi}	0,12 \pm 0,004 ^{bix}
Peso do osso seco (g)	0,05 \pm 0,002	0,06 \pm 0,002 ^b	0,06 \pm 0,002 ^b	0,06 \pm 0,002 ^b
Peso das cinzas (g)	0,03 \pm 0,001	0,04 \pm 0,001 ^b	0,04 \pm 0,002 ^b	0,04 \pm 0,002 ^b
Volume Ósseo (cm ³)	0,07 \pm 0,004	0,08 \pm 0,003	0,11 \pm 0,003 ^{bi}	0,09 \pm 0,003 ^{bix}
Dens. Óssea (g/cm ³)	1,33 \pm 0,008	1,41 \pm 0,008 ^b	1,28 \pm 0,015 ^{bi}	1,34 \pm 0,008 ^{ix}
Dens. Óssea/100g de PC	0,37 \pm 0,011	0,36 \pm 0,008	0,33 \pm 0,003 ^{bi}	0,34 \pm 0,013
Dens. Mineral (g/cm ³)	0,39 \pm 0,009	0,47 \pm 0,008 ^b	0,35 \pm 0,015 ⁱ	0,40 \pm 0,007 ^{ix}
Dens. Min./100g de PC	0,11 \pm 0,004	0,12 \pm 0,003 ^b	0,09 \pm 0,003 ^{bi}	0,10 \pm 0,004 ^{ix}
% Ósseo de Água	51,40 \pm 0,78	47,30 \pm 0,73 ^b	57,59 \pm 1,27 ^{bi}	52,85 \pm 0,54 ^{ix}
% Material Orgânico	19,43 \pm 0,27	19,18 \pm 0,40	15,20 \pm 0,48 ^{bi}	17,10 \pm 0,23 ^{bix}
% Material Mineral	29,17 \pm 0,51	33,52 \pm 0,38 ^b	27,21 \pm 0,86 ⁱ	30,05 \pm 0,36 ^{ix}
Área de Sec. Trans.(mm ²)	11,47 \pm 0,38	11,53 \pm 0,26	14,65 \pm 0,48 ^{bi}	13,12 \pm 0,33 ^{bix}

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

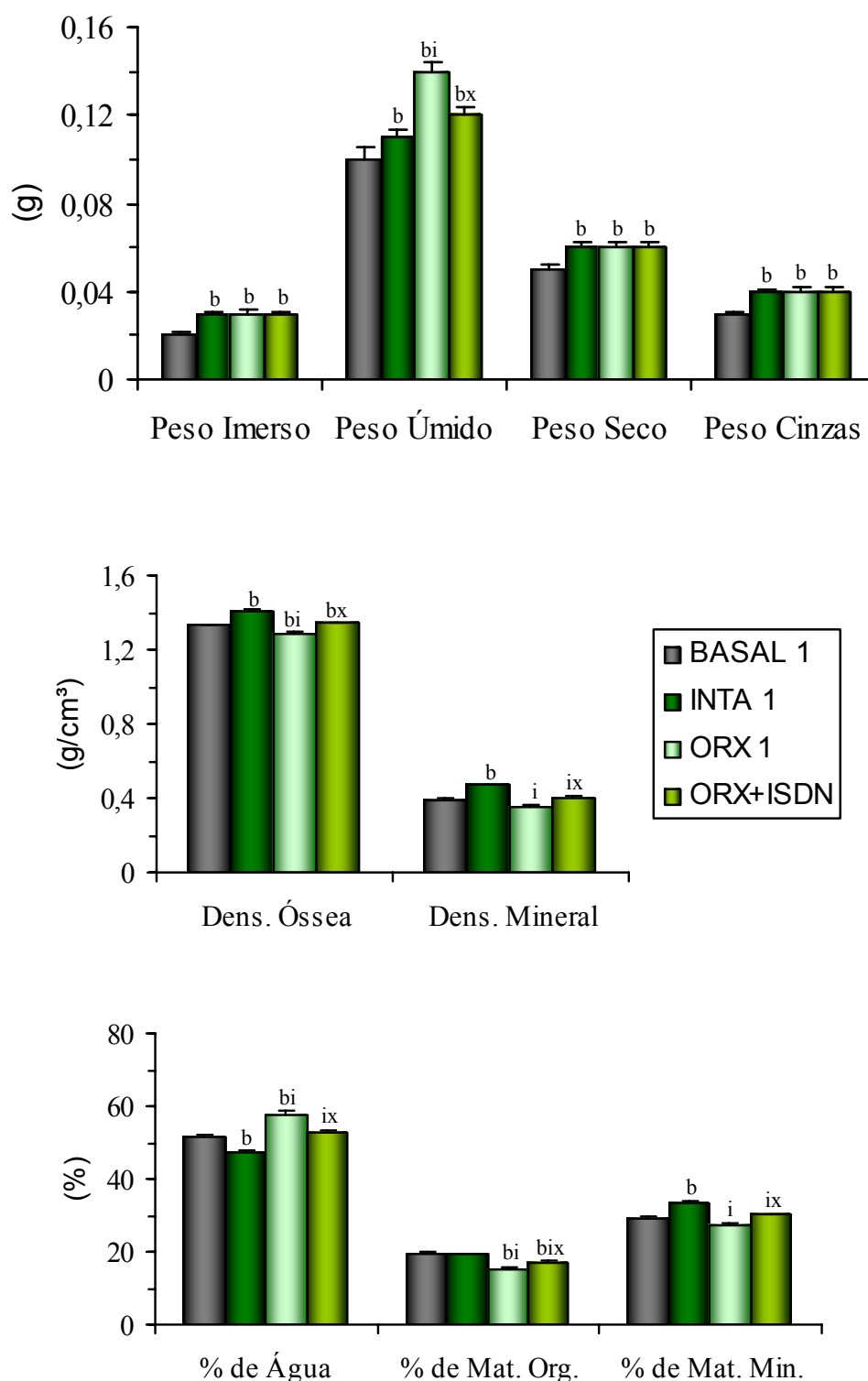


Figura 13: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: peso do osso imerso, peso do osso úmido, peso do osso desidratado, peso das cinzas ósseas, densidade óssea, densidade mineral, percentuais ósseos de água, de material orgânico e de material mineral pertencentes aos ratos dos grupos referentes ao experimento 1. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 1, ^x vs ORX 1. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

3.1.5 Análise da Superfície Óssea Trabecular Femoral por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura das epífises distais dos fêmures esquerdos, de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 1, podem ser vistas nas Figuras de 14 a 18.

Verificou-se que a estrutura óssea trabecular dos grupos BASAL 1 e INTA 1 apresentaram estruturas trabeculares em forma de platôs longitudinais, interconectados por trabéculas transversais, sem a presença de escavações evidentes (Figuras 14, 15 e 18). Os animais orquiectomizados tratados com salina ou com ISDN parecem ter sofrido consideráveis alterações na microarquitetura óssea trabecular, suas trabéculas estão aparentemente mais finas e os espaços entre elas parecem maiores. Porém, a presença de escavações não é observada e a interconectividade entre as trabéculas ainda é mantida.

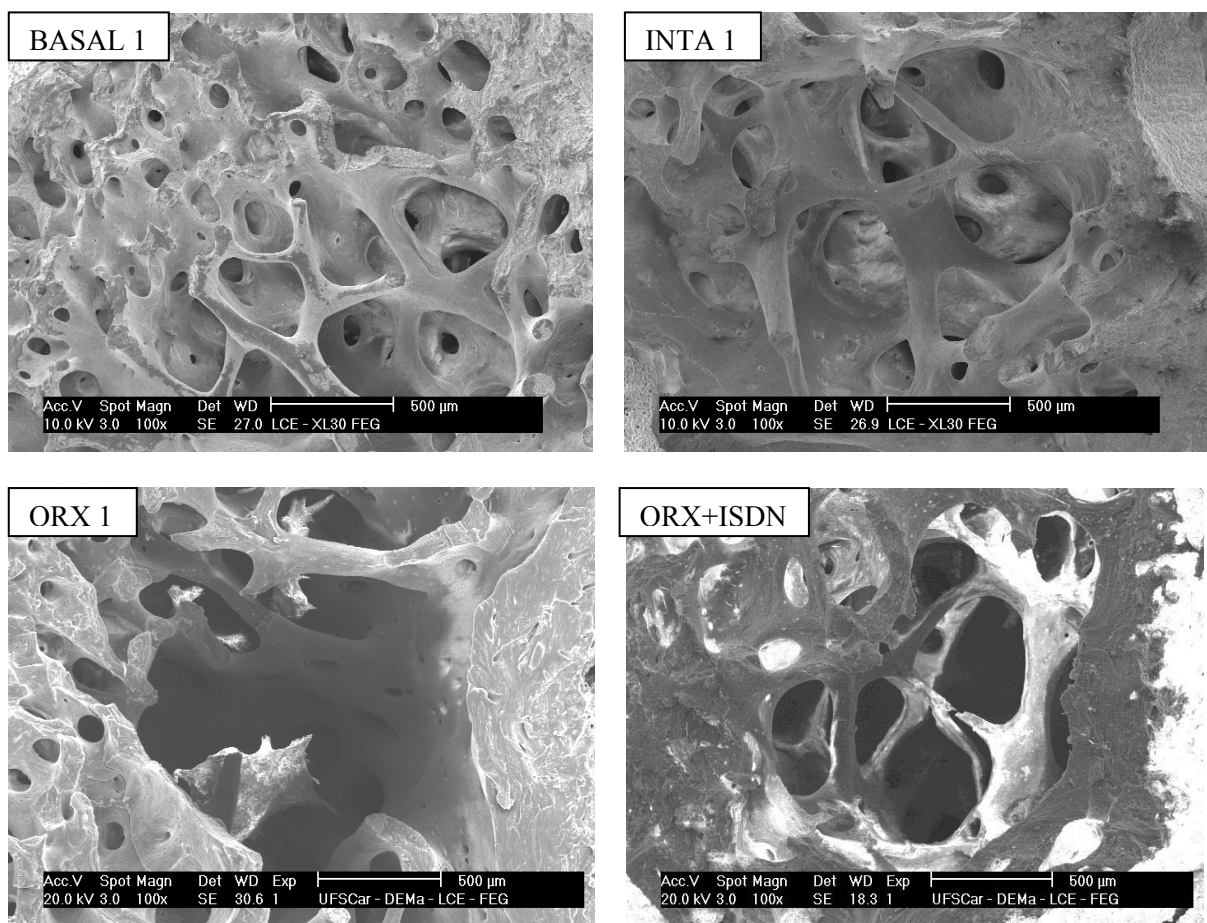


Figura 14: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de um exemplar de cada grupo que compõe o experimento 1, exibidas em aumento de 100 vezes. BASAL 1, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gv); ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv); ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv).

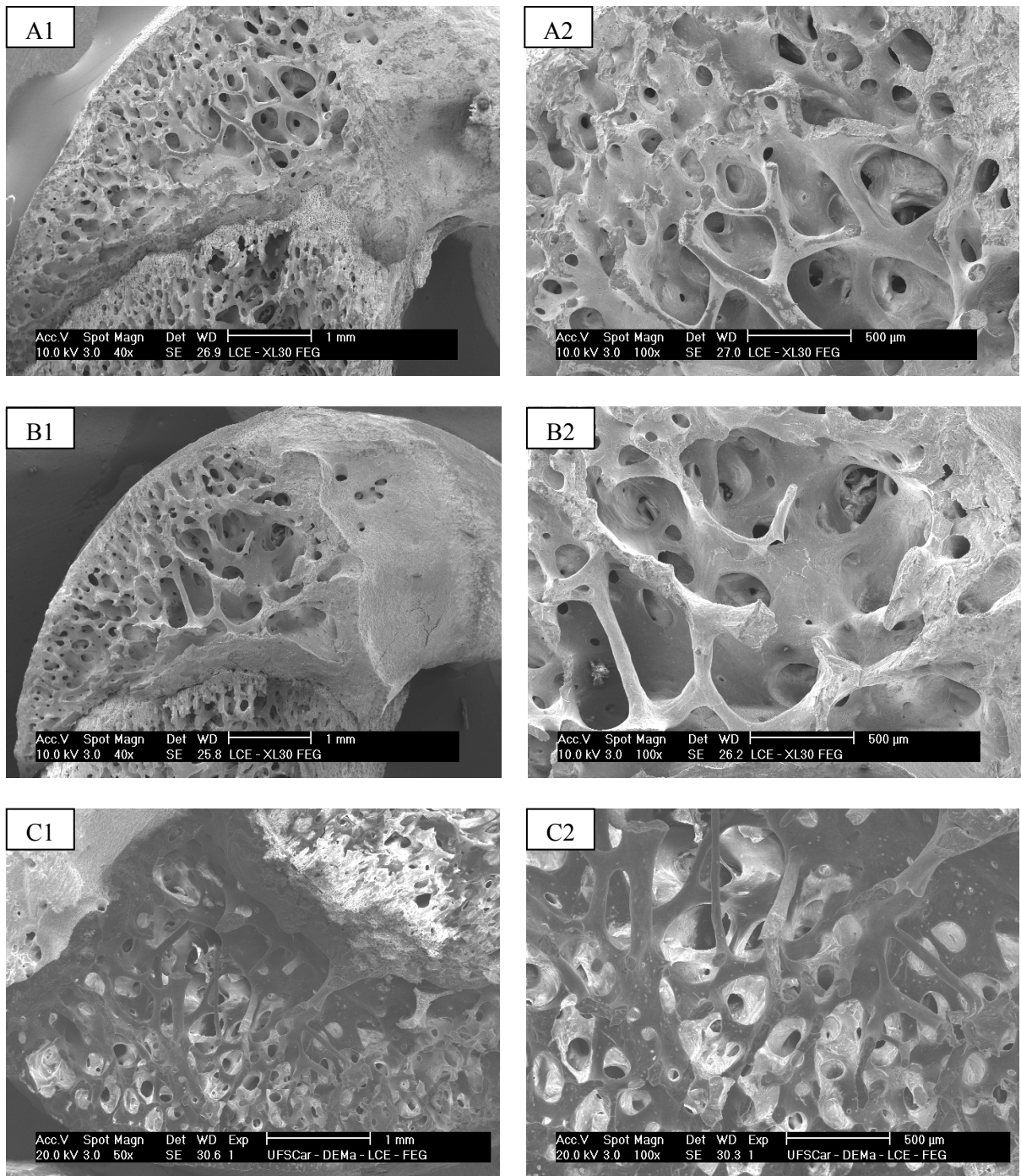


Figura 15: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo BASAL 1, animais sacrificados aos quatro meses de idade, exibidas em aumentos de 40 vezes (A1, B1), 50 vezes (C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

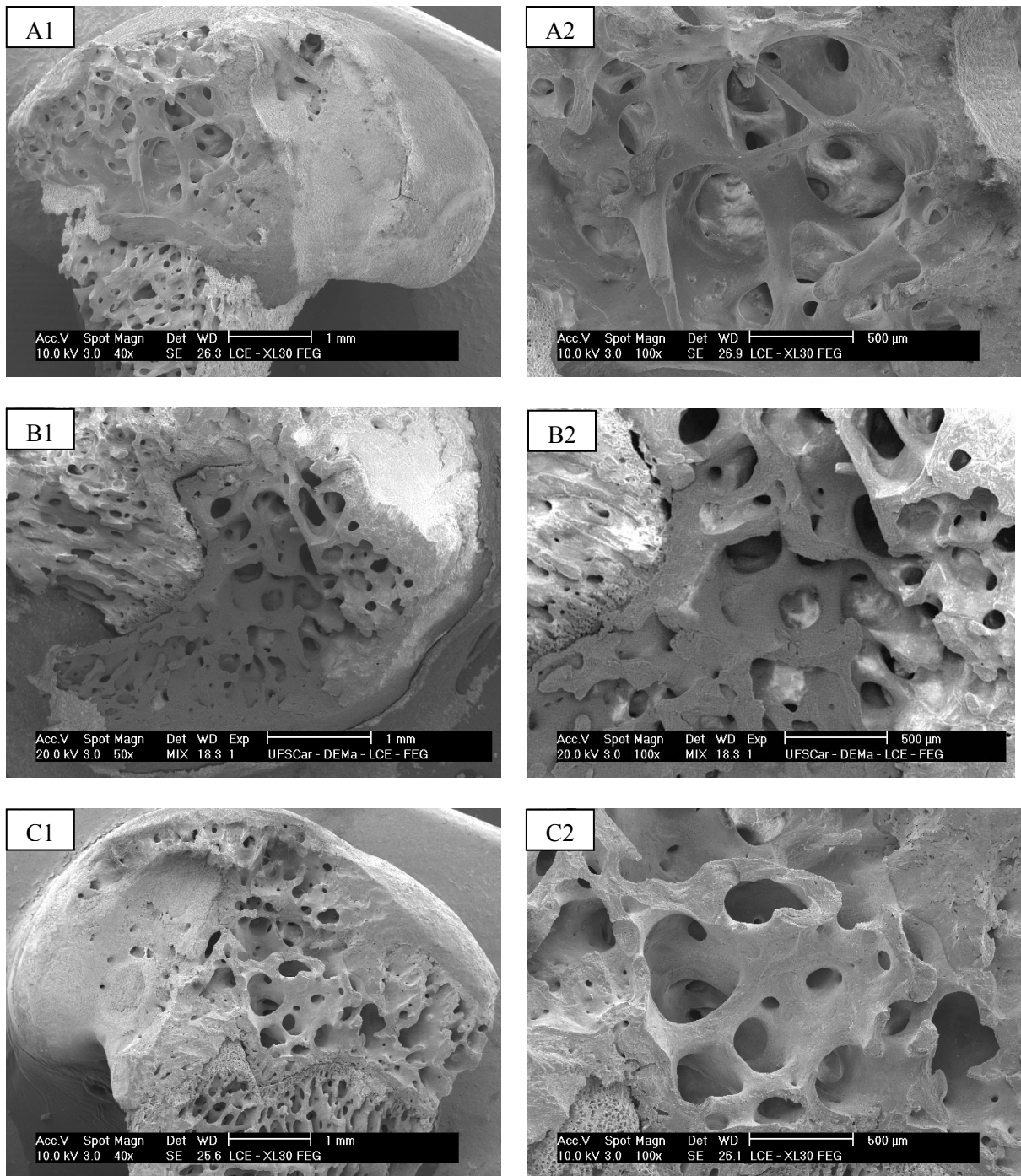


Figura 16: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo INTA 1, animais intactos tratados com salina (via gy), pertencentes ao experimento 1, exibidas em aumentos de 40 vezes (A1 e C1), de 50 vezes (B1,) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

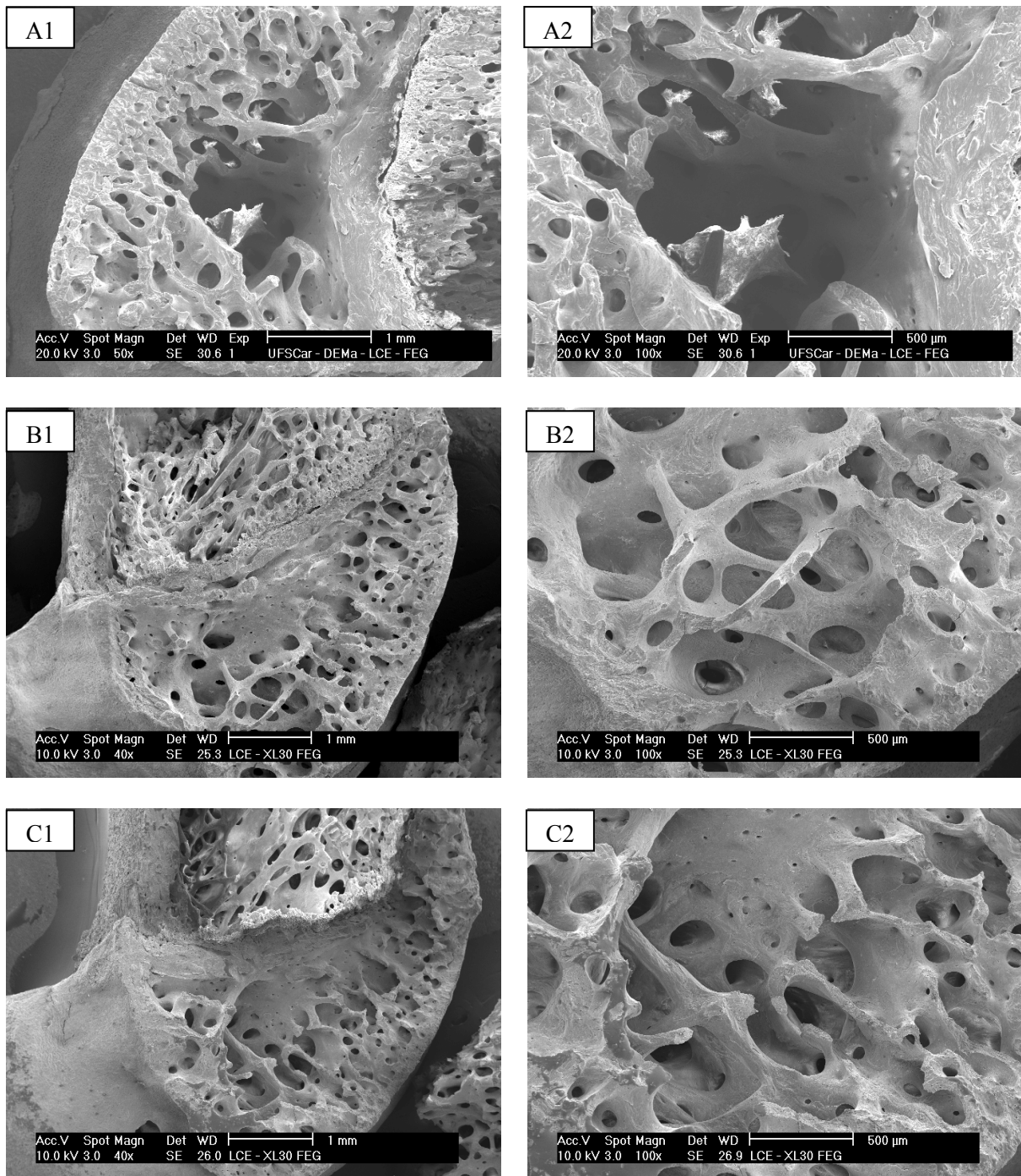


Figura 17: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX 1, animais orquiectomizados tratados com salina (via gv), pertencentes ao experimento 1, exibidas em aumentos de 40 vezes (B1 e C1), 50 vezes (A1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

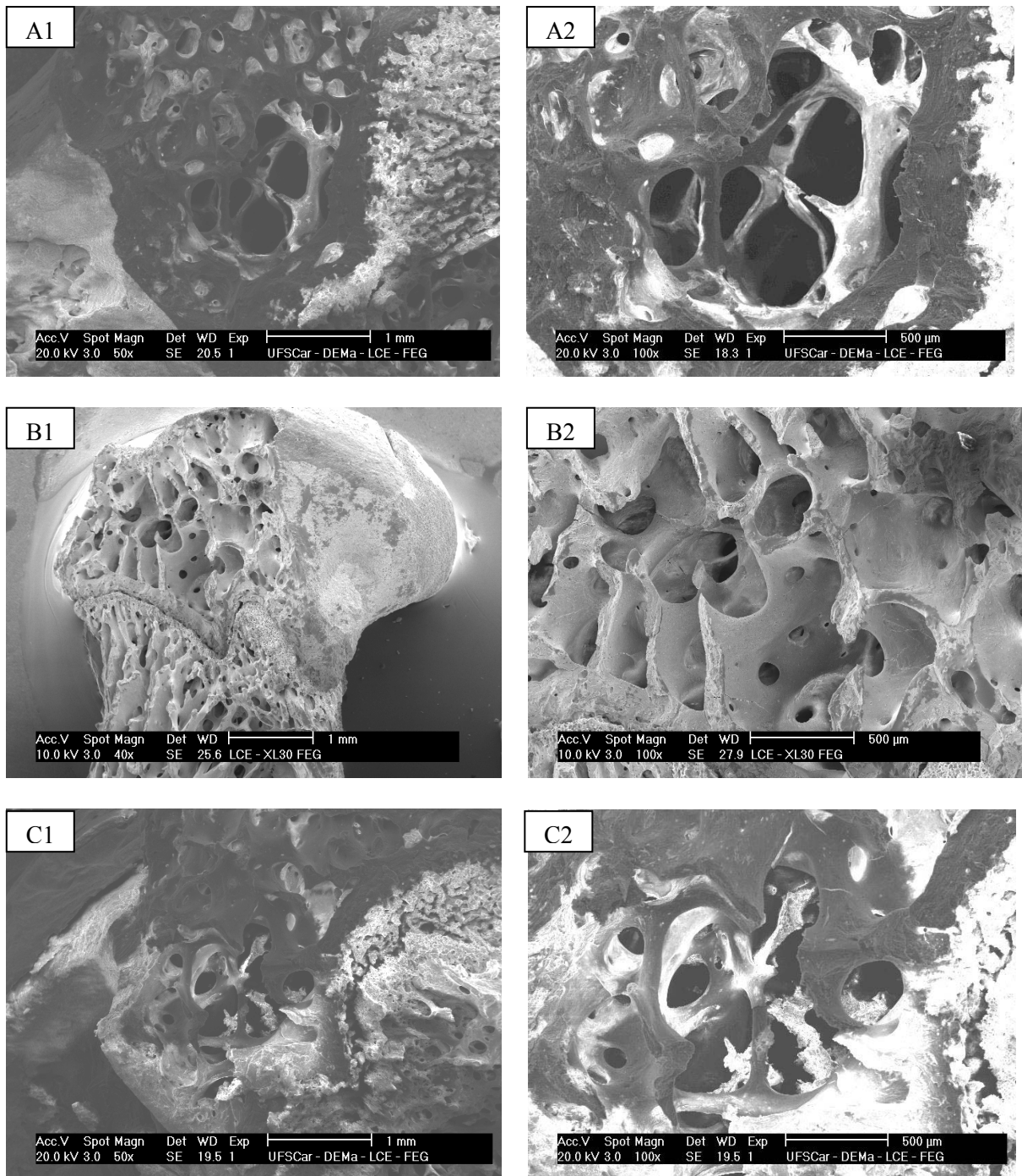


Figura 18: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX+ISDN, animais orquiectomizados tratados com ISDN (via gv), pertencentes ao experimento 1, exibidas em aumentos de 40 vezes (B1), 50 vezes (A1 e C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

3.2 Experimento 2

Efeitos do tratamento com o inibidor da síntese de NO, L-NAME, sobre fêmures e vértebras lombares de ratos orquiectomizados.

3.2.1 Propriedades Biométricas

Os valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) do peso corporal inicial e final e do ganho de peso corporal, dos quatro grupos de animais que compõem este experimento, são mostrados na Tabela 7 e na Figura 19.

Observou-se que não houve diferença estatística entre os diversos grupos experimentais referente aos parâmetros peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal.

Tabela 7: Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 2	ORX 2	ORX+L-NAME
n	9	10	8	7
PC inicial (g)	359,9 \pm 9,52	357,6 \pm 9,13	341,9 \pm 13,00	344,3 \pm 9,50
PC final (g)	-	395,2 \pm 8,41	384,0 \pm 9,06	382,9 \pm 11,25
Ganho de PC (g)	-	37,60 \pm 2,93	42,13 \pm 5,50	38,57 \pm 4,21

ⁱp<0,05 vs INTA 2. PC, peso corporal; BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

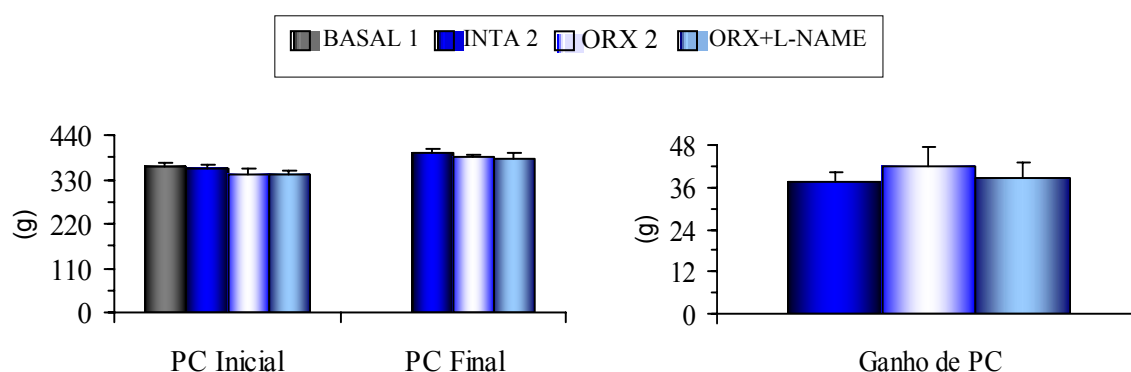


Figura 19: Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos que compõem o experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$. PC, peso corporal; BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

Os valores referentes aos parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos, dos ratos dos diferentes grupos do experimento 2, são encontrados na Tabela 8 e nas Figuras 20 e 21. Os valores médios são expressos juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), por grupo experimental.

Verificou-se que o grupo INTA 2, quando comparado ao grupo BASAL 1, apresentou um aumento significativo do comprimento ósseo, dos diâmetros externos maior e menor e do momento de inércia. O grupo ORX 2, quando comparado ao grupo BASAL 1, mostrou um aumento significativo do diâmetro externo maior da diáfise, da espessura da parede lateral da diáfise e do momento de inércia; quando comparado ao grupo INTA 2, mostrou uma diminuição significativa do comprimento ósseo, além de um aumento significativo da espessura da parede lateral da diáfise femoral. O grupo ORX+L-NAME diferiu estatisticamente do grupo BASAL 1, apenas com relação a espessura da parede posterior da diáfise femoral; apresentou-se estatisticamente menor do que o grupo INTA 2, com relação aos parâmetros: diâmetro externo menor da diáfise e espessura da parede posterior da diáfise; e apresentou-se estatisticamente menor do que o grupo ORX 2, com relação a espessura da parede lateral da diáfise femoral.

Tabela 8: Parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 2	ORX 2	ORX+L-NAME
n	9	10	8	7
L(mm)	37,86 \pm 0,29	39,55 \pm 0,27 ^b	38,53 \pm 0,24 ⁱ	38,79 \pm 0,43
Diâm. Externo > (mm)	4,32 \pm 0,06	4,57 \pm 0,07 ^b	4,56 \pm 0,06 ^b	4,50 \pm 0,12
Diâm. Externo < (mm)	3,00 \pm 0,05	3,20 \pm 0,05 ^b	3,04 \pm 0,06	2,99 \pm 0,03 ⁱ
Diâm. Interno > (mm)	2,46 \pm 0,05	2,58 \pm 0,08	2,39 \pm 0,07	2,56 \pm 0,06
Diâm. Interno < (mm)	1,59 \pm 0,04	1,73 \pm 0,05	1,68 \pm 0,06	1,64 \pm 0,03
Espes. parede lat. (mm)	1,23 \pm 0,06	1,30 \pm 0,04	1,53 \pm 0,06 ^{bi}	1,31 \pm 0,08 ^x
Espes. parede med. (mm)	0,63 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02	0,63 \pm 0,03
Espes. parede ant. (mm)	0,66 \pm 0,02	0,70 \pm 0,02	0,68 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02
Espes. Parede Post. (mm)	0,76 \pm 0,02	0,77 \pm 0,02	0,71 \pm 0,01	0,68 \pm 0,02 ^{bi}
Mom. de inércia (mm ⁴)	10,83 \pm 0,63	13,58 \pm 0,72 ^b	13,12 \pm 0,68 ^b	12,15 \pm 0,99

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2, ^x vs ORX 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

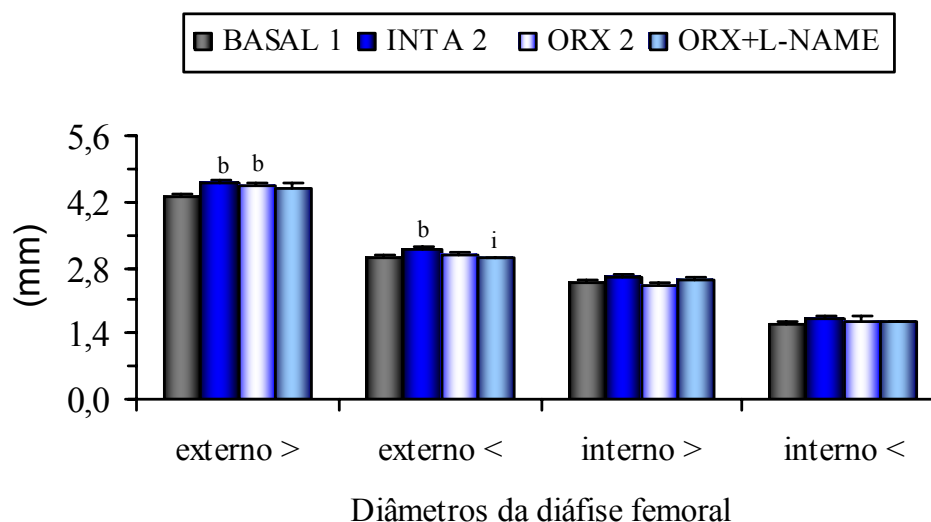


Figura 20: Diâmetros externos maior e menor, e diâmetros internos maior e menor da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

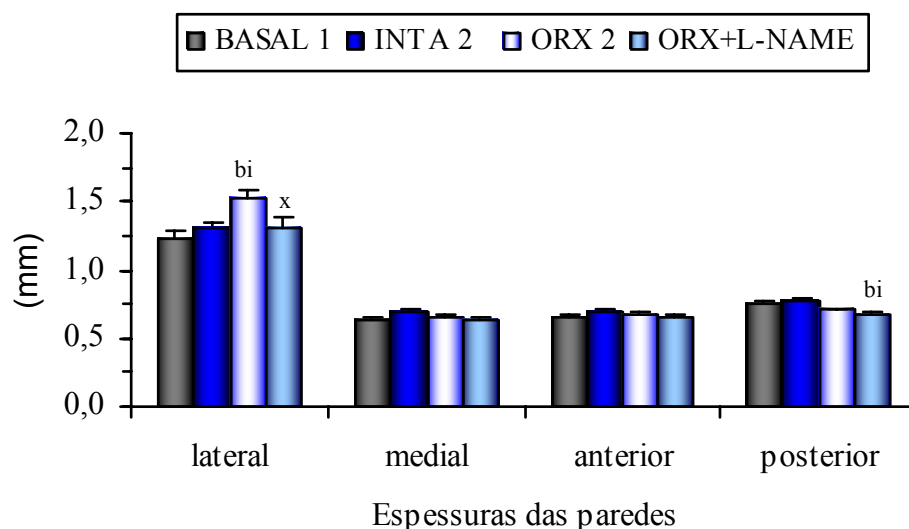


Figura 21: Espessuras das paredes lateral, medial, anterior e posterior da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 2. Encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2, ^x vs ORX 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

3.2.2 Propriedades Biomecânicas

Os valores referentes aos parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos ratos dos diferentes grupos do experimento 2, obtidos a partir de ensaio mecânico de flexão a três pontos, estão apresentados na Tabela 9 e nas Figuras 22 e 23. Os valores médios são vistos juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) de cada grupo experimental.

O grupo INTA 2, quando comparado ao grupo BASAL 1, mostrou um aumento significativo dos parâmetros: força no limite elástico, rigidez, resiliência, força máxima, capacidade de absorver energia, força de ruptura, tenacidade e momento máximo. O grupo ORX 2, quando comparado ao grupo BASAL 1, apresentou força máxima e momento máximo estatisticamente maiores. Quando comparado ao grupo INTA 2, o grupo ORX 2 expressou valores significativamente menores de: força no limite elástico, rigidez, força máxima, capacidade de absorver energia, força de ruptura e momento máximo. O grupo ORX+L-NAME quando comparado ao grupo BASAL 1, obteve aumento significativo de: força no limite elástico, resiliência, força máxima, força de ruptura e momento máximo. Quando comparado ao grupo INTA 2, o grupo ORX+L-NAME se mostrou estatisticamente

menor em relação aos parâmetros: rigidez, força máxima, deformação no ponto de força máxima, capacidade de absorver energia, deformação no ponto de ruptura, tenacidade e momento máximo. Em relação ao grupo ORX 2, o grupo ORX+L-NAME apresentou valores estatisticamente iguais em todos os parâmetros estudados.

Tabela 9: Parâmetros biomecânicos do fêmur direito de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos através do teste de flexão a três pontos. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 2	ORX 2	ORX+L-NAME
n	9	10	8	7
Força limite elástico (N)	78,89 \pm 2,17	104,7 \pm 4,21 ^b	88,72 \pm 3,81 ⁱ	94,54 \pm 4,23 ^b
Deform.limit.elást. (mm)	0,44 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03	0,42 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03
Rigidez (N/mm)	199,7 \pm 9,24	273,2 \pm 9,77 ^b	221,6 \pm 6,14 ⁱ	235,4 \pm 16,18 ⁱ
Resiliência (mJ)	16,84 \pm 0,95	22,03 \pm 1,32 ^b	18,60 \pm 1,79	20,09 \pm 1,32 ^b
Força máxima (N)	100,5 \pm 2,64	142,3 \pm 5,08 ^b	116,7 \pm 2,56 ^{bi}	120,6 \pm 3,99 ^{bi}
Deform.Forç.máx. (mm)	0,73 \pm 0,03	0,85 \pm 0,04	0,76 \pm 0,02	0,69 \pm 0,05 ⁱ
Capac.absor.energia (mJ)	44,16 \pm 2,84	71,85 \pm 4,45 ^b	54,93 \pm 4,33 ⁱ	49,35 \pm 4,42 ⁱ
Força de ruptura (N)	79,56 \pm 5,10	116,8 \pm 6,49 ^b	93,73 \pm 6,32 ⁱ	106,6 \pm 5,77 ^b
Deform. ruptura (mm)	1,14 \pm 0,06	1,19 \pm 0,04	1,18 \pm 0,09	1,01 \pm 0,04 ⁱ
Tenacidade (mJ)	79,76 \pm 4,13	115,2 \pm 8,79 ^b	98,24 \pm 9,38	84,57 \pm 3,48 ⁱ
Momento máx. (N.mm)	545,2 \pm 14,30	772,1 \pm 27,58 ^b	633,0 \pm 13,89 ^{bi}	654,0 \pm 21,67 ^{bi}

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc). Deform.limit.elást., deformação no limite elástico; Deform.Forç.máx., deformação no ponto de força máxima; Capac.absor.energia, capacidade de absorver energia; Deform. ruptura, deformação no ponto de ruptura; máx., máximo (a).

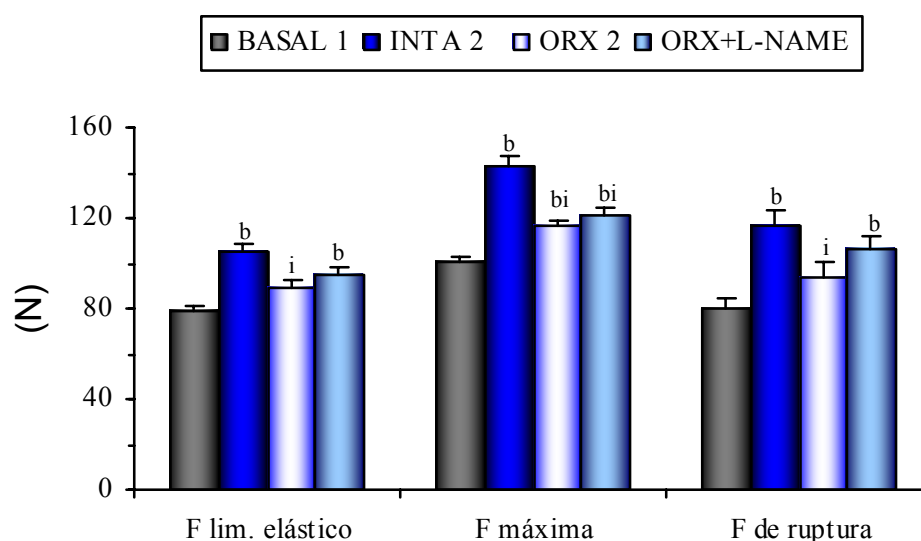


Figura 22: Valores de forças aplicadas ao fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos. A força no limite elástico (F lim. elástico), a força máxima aplicada (F máxima) e a força no ponto de ruptura (F de ruptura) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

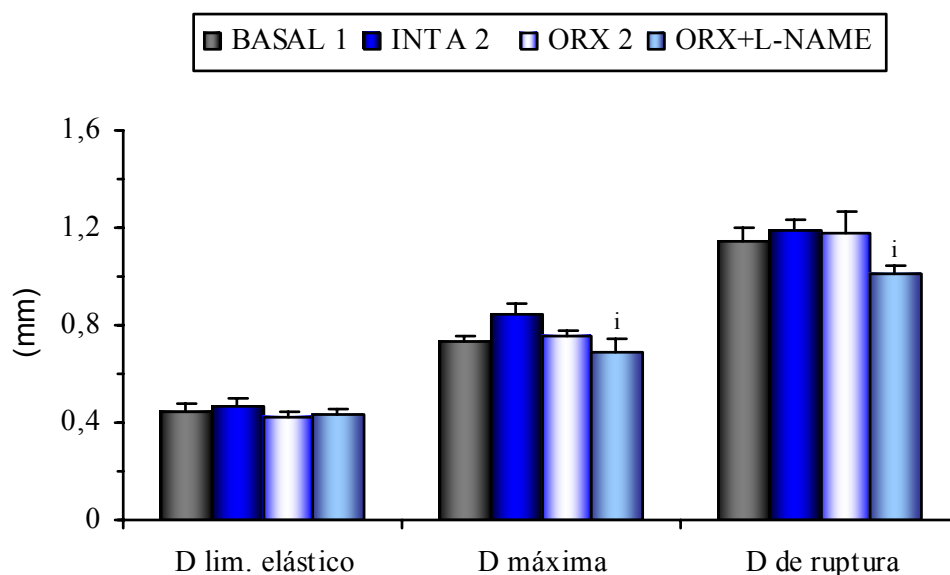


Figura 23: Deformações do fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos. A deformação no limite elástico (D lim. elástico), a deformação no ponto de força máxima (D máxima) e a deformação no ponto de ruptura (D de ruptura) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. ⁱ $p < 0,05$ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

Os valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) dos parâmetros biomecânicos, obtidos a partir de teste de compressão dos corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 2, encontram-se apresentados na Tabela 10 e nas Figuras 24 e 25.

Observou-se que o grupo INTA 2 apresentou um aumento significativo da força no limite elástico, da capacidade de absorver energia e da tenacidade, quando comparado ao grupo BASAL 1. O grupo ORX 2 se mostrou estatisticamente igual ao grupo BASAL 1; e estatisticamente menor do que o grupo INTA 2, com relação aos parâmetros força no limite elástico e tenacidade. O grupo ORX+L-NAME obteve força no limite elástico e capacidade de absorver energia, estatisticamente maiores, e deformação no ponto de força máxima, estatisticamente menor, do que o grupo BASAL 1. Quando comparado ao grupo INTA 2, o grupo ORX+L-NAME apresentou valores significativamente menores dos parâmetros rigidez e força máxima. Com relação ao grupo ORX 2, o grupo ORX+L-NAME apresentou um aumento significativo da capacidade de absorver energia.

Tabela 10: Parâmetros biomecânicos de corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos a partir de teste de compressão. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 2	ORX 2	ORX+L-NAME
n	9	10	8	7
Força limite elástico (N)	129,3 \pm 6,97	176,5 \pm 8,60 ^b	127,9 \pm 9,77 ⁱ	153,4 \pm 4,60 ^b
Deform. limite elást. (mm)	0,38 \pm 0,06	0,38 \pm 0,04	0,36 \pm 0,05	0,45 \pm 0,03
Rigidez (N/mm)	740,9 \pm 110,3	756,5 \pm 82,0	655,9 \pm 101,8	517,7 \pm 32,5 ⁱ
Capac. absorv. energ. (mJ)	32,50 \pm 7,19	42,29 \pm 4,06 ^b	29,55 \pm 5,05	44,70 \pm 2,61 ^{bx}
Força Máxima (N)	169,7 \pm 11,2	190,9 \pm 8,53	153,1 \pm 12,7	154,9 \pm 4,66 ⁱ
Deformação Máx. (mm)	2,90 \pm 0,35	1,92 \pm 0,48	1,65 \pm 0,49	0,73 \pm 0,32 ^b
Tenacidade (Mpa)	0,08 \pm 0,00	0,10 \pm 0,01 ^b	0,08 \pm 0,00 ⁱ	0,08 \pm 0,01

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2, ^x vs ORX 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

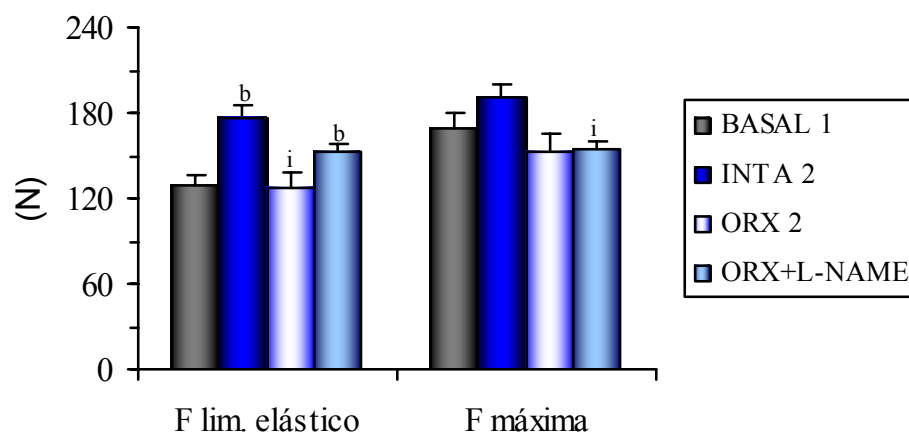


Figura 24: Valores de forças aplicadas ao corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos que compõem o experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão. A força no limite elástico (F lim. elástico) e a força máxima aplicada (F máxima) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

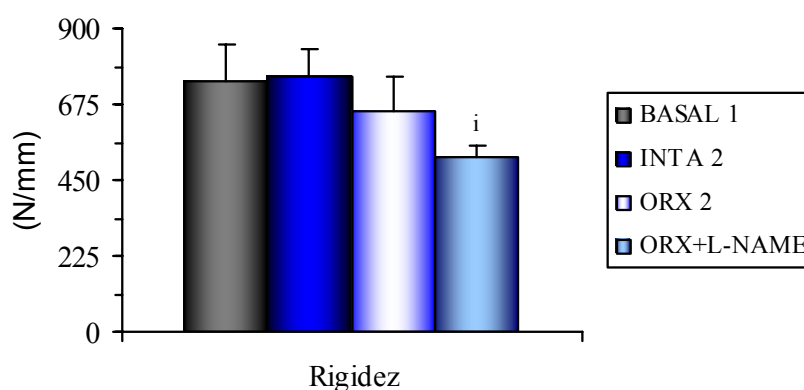


Figura 25: Valores de rigidez do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. ⁱ $p < 0,05$ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

3.2.3 Densitometria Óssea do Fêmur Esquerdo e da Sexta Vértebra Lombar

Os valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD), do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 2, obtidas através de densitometria de duplo fóton, podem ser observadas na Tabela 11 e na Figura 26.

Verificou-se que no FE, apenas a BA do terço proximal foi estatisticamente igual entre os grupos INTA 2 e BASAL 1, e que todos os demais parâmetros densitométricos do grupo INTA 2 foram estatisticamente maiores do que os do grupo BASAL 1. O grupo ORX 2, quando comparado ao grupo BASAL 1, apresentou aumento significativo dos parâmetros: BMD do FE total; BMD do terço distal; BMC e BMD do terço médio do FE. Quando comparado ao grupo INTA 2, o grupo ORX 2 mostrou uma redução significativa de BMC e BMD do FE total; BMC, BA e BMD do terço distal do FE; BMC e BMD do terço proximal do FE. O grupo ORX+L-NAME, quando comparado ao grupo BASAL 1, expressou um aumento significativo dos valores médios de: BMC e BMD do FE total; BMC do terço distal do FE; BMC e BMD do terço médio do FE; BMC e BMD do terço proximal do FE. Quando comparado ao grupo INTA 2, o grupo ORX+L-NAME apresentou diminuição significativa de BMC e BA do terço distal do FE e não foi estatisticamente diferente em relação aos demais parâmetros densitométricos. Em relação ao grupo ORX 2, o grupo ORX+L-NAME apresentou valores médios estatisticamente iguais quanto a todos os parâmetros analisados.

Na análise da VL6, observou-se que o grupo INTA 2 evidenciou valores médios estatisticamente maiores, em todos os parâmetros estudados, quando comparado ao grupo BASAL 1. O grupo ORX 2 mostrou BMC, BA e BMD estatisticamente maiores do que os do grupo BASAL 1, porém, BMC significativamente menor do que o do grupo INTA 2. O grupo ORX+L-NAME apresentou aumento significativo de todos os parâmetros estudados quando comparado ao grupo BASAL 1, e não apresentou diferenças estatísticas com relação aos grupos INTA 2 e ORX 2.

Tabela 11: Valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 2	ORX 2	ORX+L-NAME
n	9	10	8	7
BMC (g) FE total	0,36 \pm 0,012	0,45 \pm 0,013 ^b	0,39 \pm 0,008 ⁱ	0,41 \pm 0,017 ^b
BA (cm ²) FE total	2,40 \pm 0,050	2,58 \pm 0,053 ^b	2,40 \pm 0,033	2,46 \pm 0,069
BMD (g/cm ²) FE total	0,15 \pm 0,002	0,17 \pm 0,003 ^b	0,16 \pm 0,002 ^{bi}	0,17 \pm 0,003 ^b
BMC (g) 1/3 distal FE	0,13 \pm 0,003	0,16 \pm 0,004 ^b	0,13 \pm 0,003 ⁱ	0,14 \pm 0,005 ⁱ
BA (cm ²) 1/3 distal FE	0,86 \pm 0,016	0,91 \pm 0,014 ^b	0,82 \pm 0,014 ⁱ	0,84 \pm 0,023 ⁱ
BMD(g/cm ²) 1/3 distal FE	0,15 \pm 0,001	0,17 \pm 0,002 ^b	0,16 \pm 0,002 ^{bi}	0,17 \pm 0,002 ^b
BMC (g) 1/3 médio FE	0,10 \pm 0,004	0,12 \pm 0,005 ^b	0,11 \pm 0,004 ^b	0,12 \pm 0,005 ^b
BA (cm ²) 1/3 médio FE	0,67 \pm 0,014	0,72 \pm 0,015 ^b	0,70 \pm 0,013	0,71 \pm 0,021
BMD(g/cm ²)1/3 médio FE	0,15 \pm 0,003	0,17 \pm 0,004 ^b	0,16 \pm 0,003 ^b	0,16 \pm 0,003 ^b
BMC (g) 1/3 prox. FE	0,13 \pm 0,005	0,16 \pm 0,005 ^b	0,14 \pm 0,004 ⁱ	0,16 \pm 0,007 ^b
BA (cm ²) 1/3 prox. FE	0,86 \pm 0,021	0,92 \pm 0,016	0,87 \pm 0,013	0,91 \pm 0,029
BMD(g/cm ²) 1/3 prox. FE	0,16 \pm 0,003	0,18 \pm 0,003 ^b	0,16 \pm 0,003 ⁱ	0,17 \pm 0,003 ^b
BMC (g) VL6	0,084 \pm 0,004	0,110 \pm 0,003 ^b	0,100 \pm 0,003 ^{bi}	0,101 \pm 0,005 ^b
BA (cm ²) VL6	0,98 \pm 0,023	1,13 \pm 0,014 ^b	1,08 \pm 0,020 ^b	1,10 \pm 0,032 ^b
BMD (g/cm ²) VL6	0,086 \pm 0,002	0,097 \pm 0,002 ^b	0,092 \pm 0,002 ^b	0,092 \pm 0,002 ^b

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

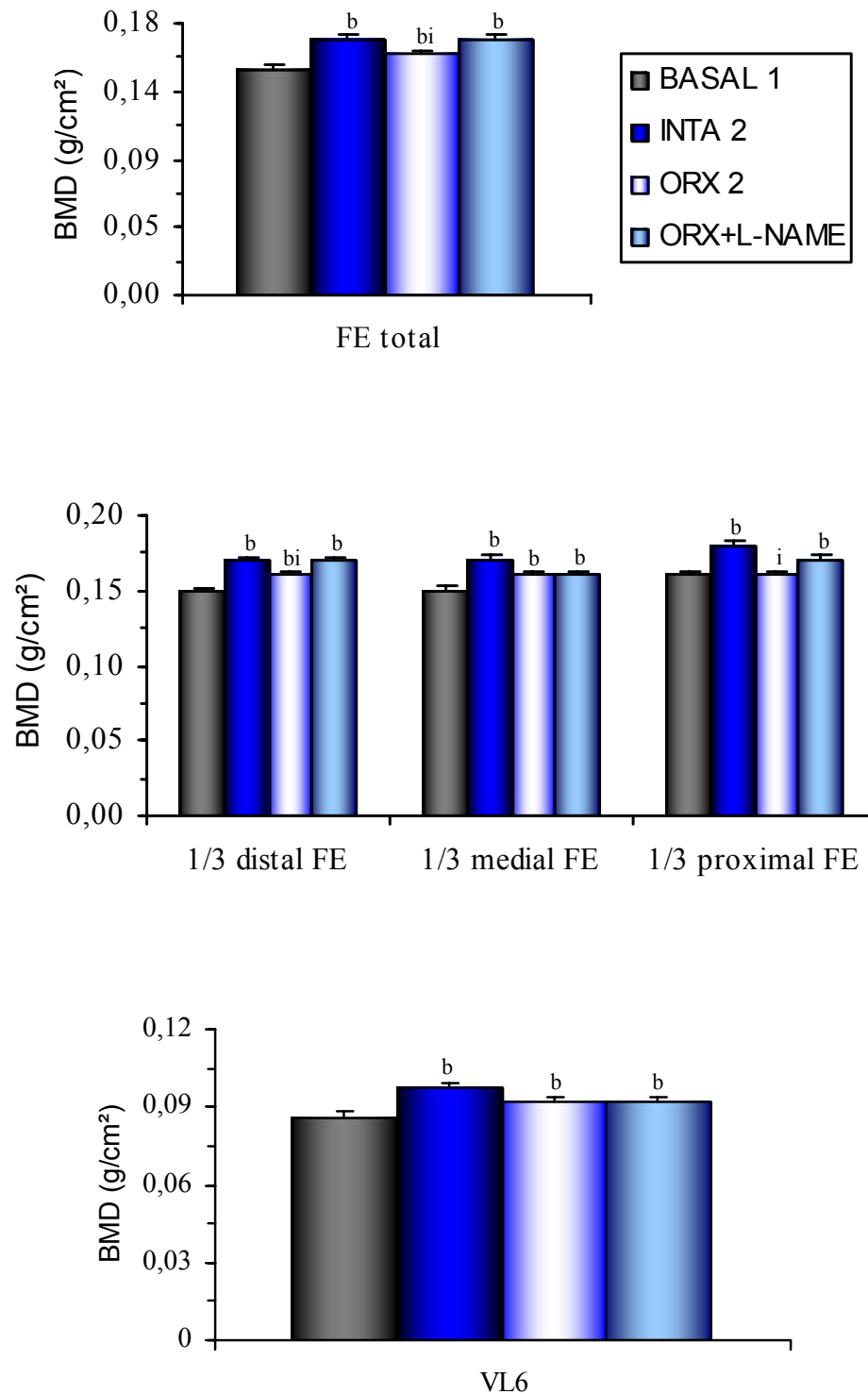


Figura 26: Valores de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

3.2.4 Propriedades Físicas do Corpo Vertebral

Os valores médios dos parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar (VL5) de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 2, estão apresentados na Tabela 12 e nas Figuras 27 e 28.

Os parâmetros físicos do corpo vertebral do grupo INTA 2, quando comparados aos do grupo BASAL 1, mostraram um aumento significativo de: altura, peso imerso, peso úmido, peso seco, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral óssea, percentual ósseo de material orgânico e do percentual ósseo de material mineral; além de uma diminuição significativa do percentual ósseo de água. No grupo ORX 2, os parâmetros: peso imerso, densidade óssea, densidade mineral óssea, percentual ósseo de material mineral, foram estatisticamente maiores do que no grupo BASAL 1. Quando comparado ao grupo INTA 2, o grupo ORX 2 apresentou aumento significativo do percentual ósseo de água; além de diminuição significativa dos parâmetros: peso úmido, peso seco, peso das cinzas, percentuais ósseos de material orgânico e de material mineral. O grupo ORX+L-NAME, quando comparado ao grupo BASAL 1, mostrou um aumento significativo dos parâmetros: altura, peso imerso, peso seco, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral óssea e percentual de material mineral; sendo estatisticamente menor com relação ao percentual ósseo de água. Com relação ao grupo INTA 2, observou-se que o grupo ORX+L-NAME apresentou uma diminuição significativa do percentual ósseo de material orgânico e da área de secção transversa e um aumento significativo do percentual ósseo de água. Quando comparado ao grupo ORX 2, o grupo ORX+L-NAME não apresentou diferenças estatísticas com relação a nenhum dos parâmetros estudados neste item.

Tabela 12: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 1	INTA 2	ORX 2	ORX+L-NAME
n	9	10	8	7
Altura (mm)	6,28 \pm 0,15	6,64 \pm 0,08 ^b	6,63 \pm 0,16	6,93 \pm 0,15 ^b
Peso do osso imerso (g)	0,024 \pm 0,001	0,031 \pm 0,001 ^b	0,028 \pm 0,001 ^b	0,029 \pm 0,001 ^b
Peso do osso úmido (g)	0,096 \pm 0,005	0,110 \pm 0,003 ^b	0,099 \pm 0,004 ⁱ	0,104 \pm 0,004
Peso do osso seco (g)	0,047 \pm 0,002	0,059 \pm 0,002 ^b	0,049 \pm 0,002 ⁱ	0,054 \pm 0,002 ^b
Peso das cinzas (g)	0,028 \pm 0,001	0,037 \pm 0,001 ^b	0,031 \pm 0,001 ⁱ	0,033 \pm 0,002 ^b
Volume Ósseo (cm ³)	0,07 \pm 0,004	0,08 \pm 0,002	0,07 \pm 0,004	0,08 \pm 0,003
Dens. Óssea (g/cm ³)	1,33 \pm 0,008	1,39 \pm 0,006 ^b	1,41 \pm 0,036 ^b	1,38 \pm 0,005 ^b
Dens. Óssea/100g de PC	0,37 \pm 0,011	0,35 \pm 0,007	0,37 \pm 0,013	0,36 \pm 0,010
Dens. Mineral (g/cm ³)	0,39 \pm 0,009	0,46 \pm 0,006 ^b	0,44 \pm 0,018 ^b	0,44 \pm 0,008 ^b
Dens. Min./100g de PC	0,11 \pm 0,004	0,12 \pm 0,002	0,11 \pm 0,005	0,12 \pm 0,003
% Ósseo de Água	51,40 \pm 0,78	46,66 \pm 0,44 ^b	50,31 \pm 0,99 ⁱ	48,60 \pm 0,53 ^{bi}
% Material Orgânico	19,43 \pm 0,27	20,19 \pm 0,16 ^b	18,57 \pm 0,32 ⁱ	19,38 \pm 0,48 ⁱ
% Material Mineral	29,17 \pm 0,51	33,16 \pm 0,31 ^b	31,12 \pm 0,70 ^{bi}	32,02 \pm 0,46 ^b
Área de Sec. Trans.(mm ²)	11,47 \pm 0,38	11,94 \pm 0,24	10,60 \pm 0,44 ⁱ	10,88 \pm 0,25 ⁱ

p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

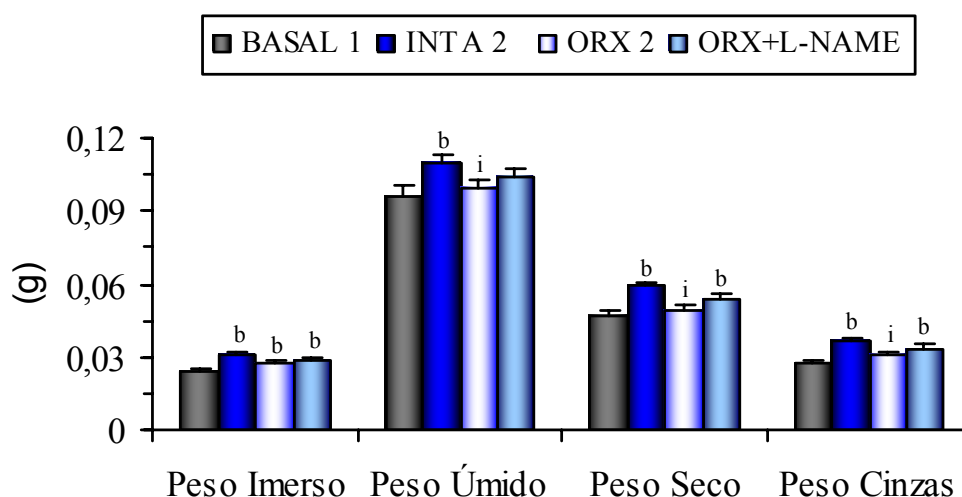


Figura 27: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: peso do osso imerso, peso do osso úmido, peso do osso desidratado e peso das cinzas ósseas de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. p<0,05: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

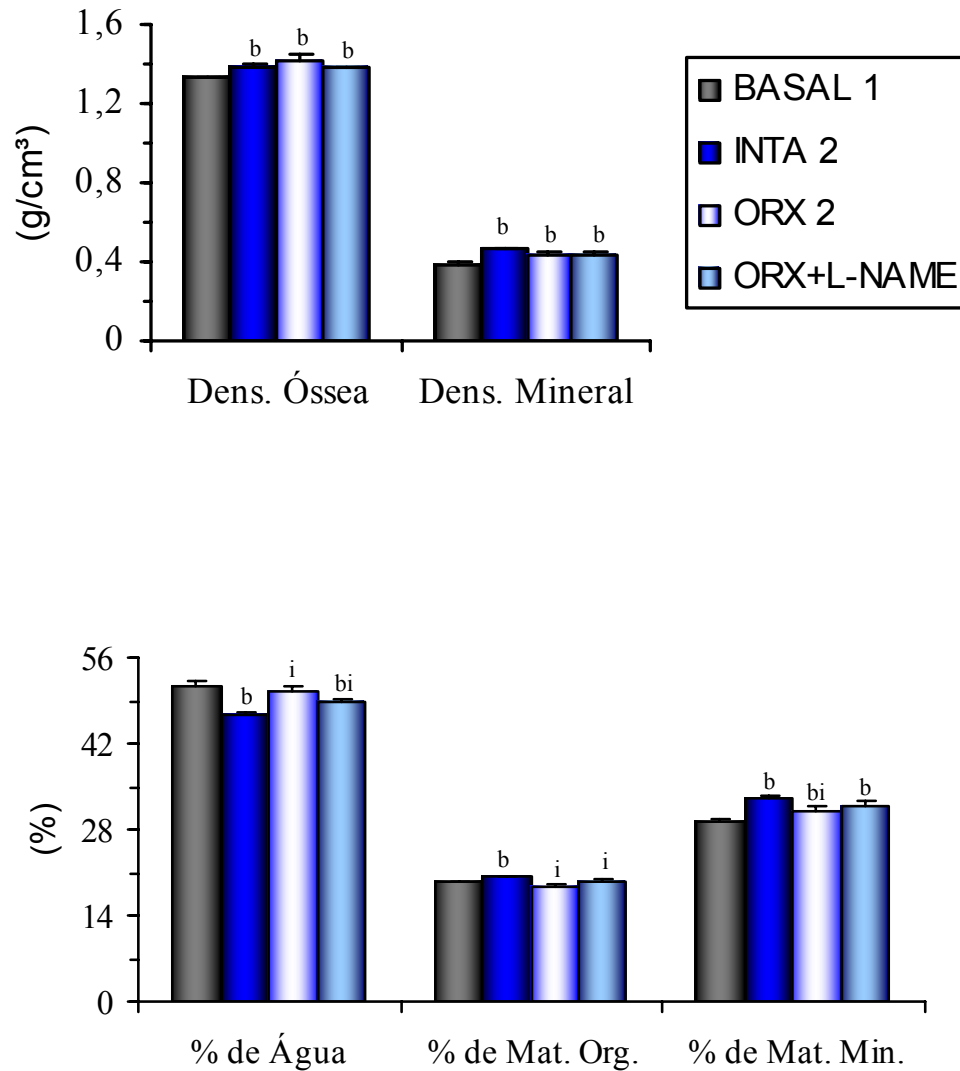


Figura 28: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: densidade óssea, densidade mineral óssea, percentuais ósseos de água, de material orgânico e de material mineral de ratos dos grupos referentes ao experimento 2. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 1, ⁱ vs INTA 2. BASAL 1, animais intactos, não tratados, sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

3.2.5 Análise da Superfície Óssea Trabecular Femoral por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura das epífises distais dos fêmures esquerdos de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 2, podem ser vistas nas Figuras 29, 30, 31, 32 e 33.

As micrografias dos animais tratados com L-NAME quando comparadas as dos grupos INTA 2 e BASAL 1 parece mostrar um maior espaçamento entre as trabéculas. Porém, a presença de escavações não é observada e a interconectividade entre as trabéculas parece ter sido preservada. Nas micrografias do grupo ORX tratado com salina a presença de escavações é facilmente visualizada.

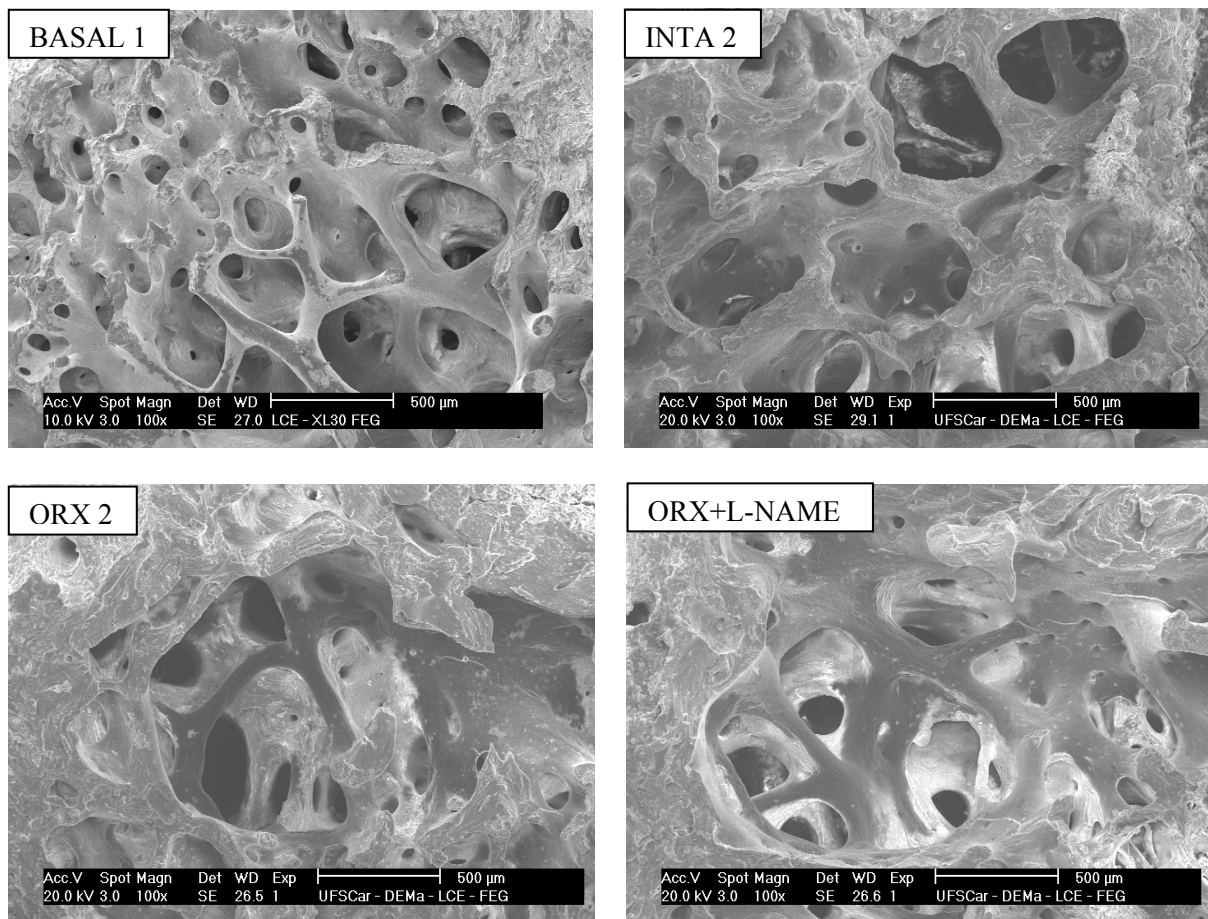


Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur, de um exemplar de cada grupo que compõe o experimento 2, exibidas em aumento de 100 vezes. BASAL 1, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc); ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc); ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc).

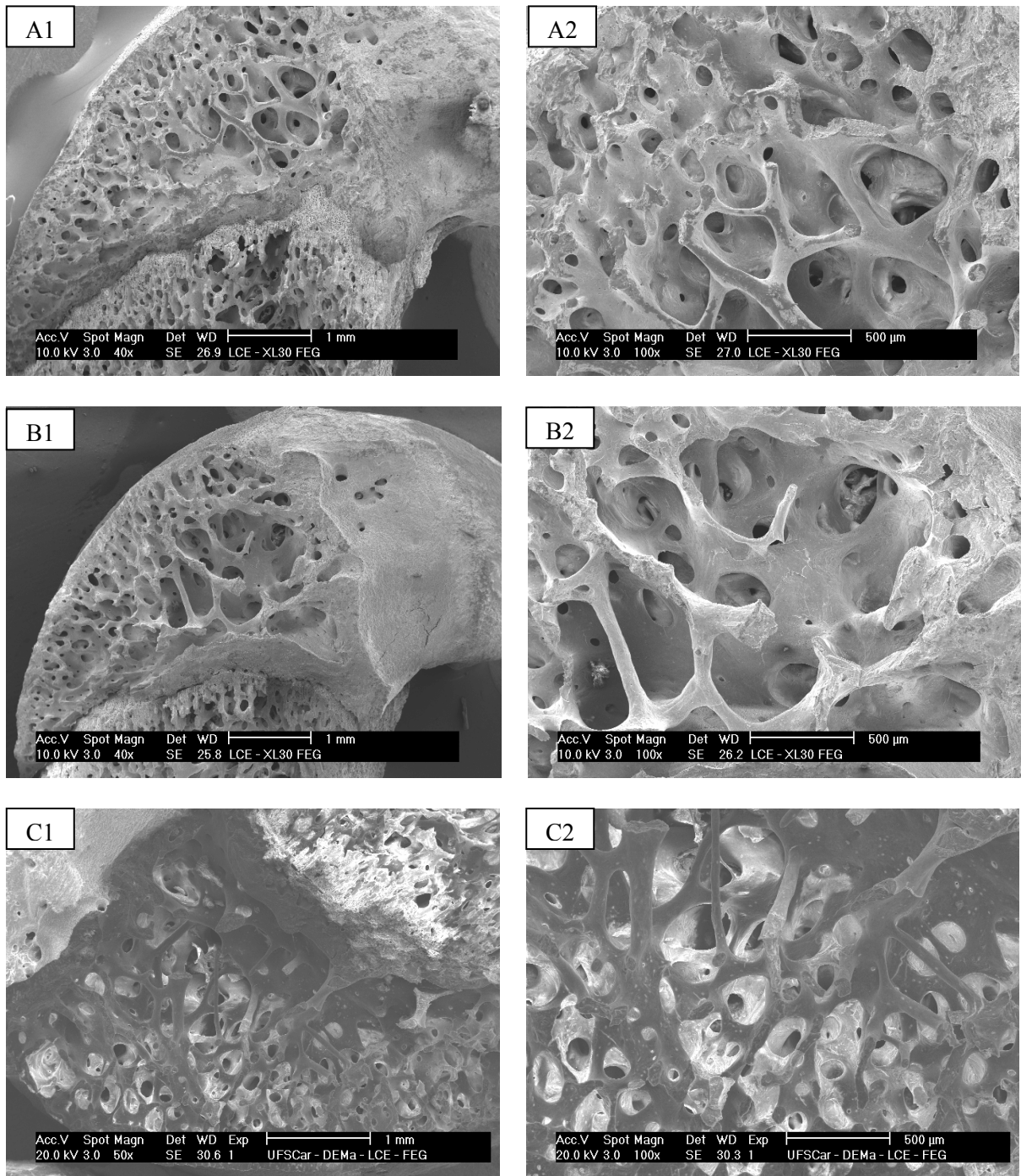


Figura 30: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo BASAL 1, animais sacrificados aos quatro meses de idade, exibidas em aumentos de 40 vezes (A1 e B1), 50 vezes (C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

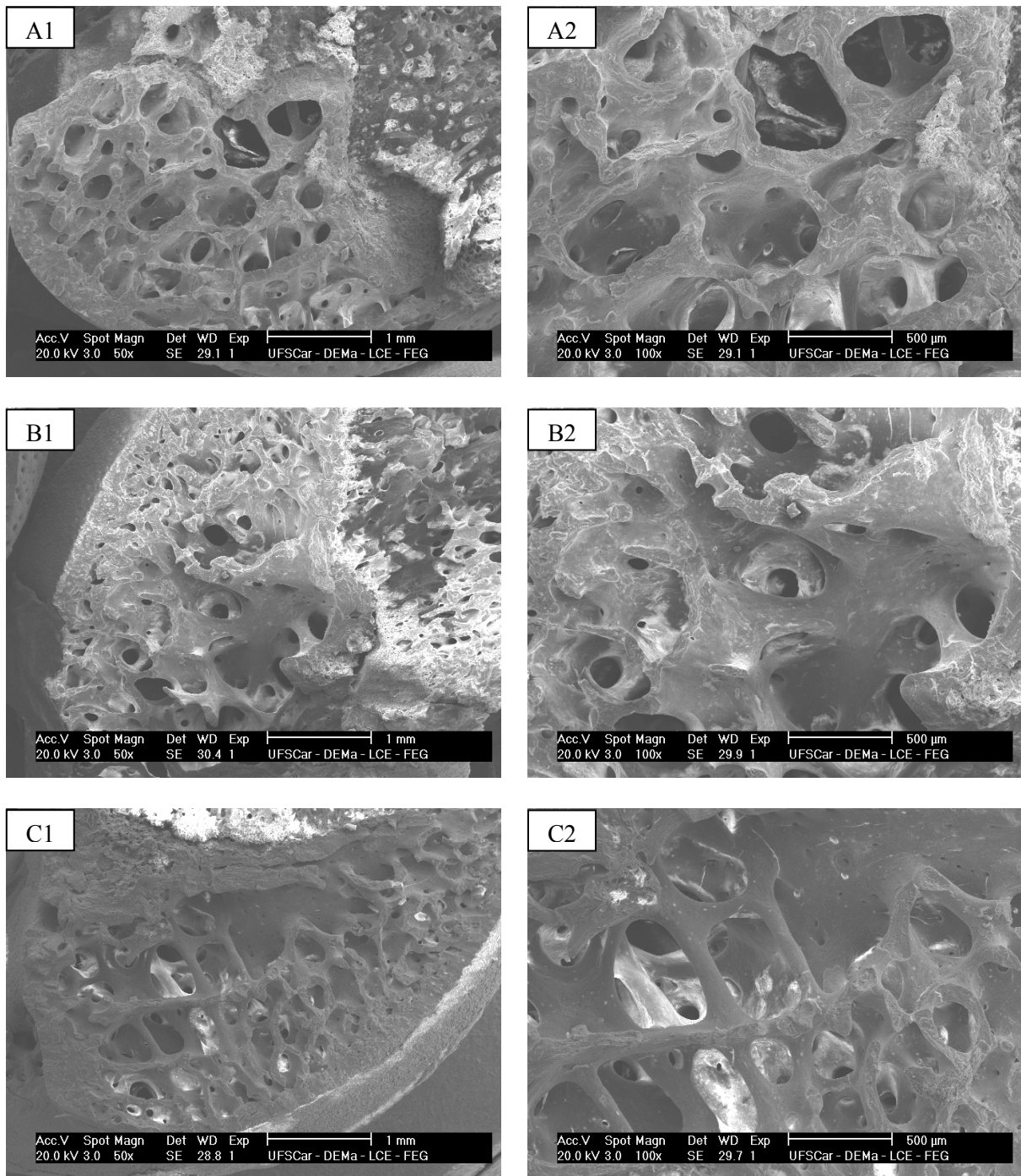


Figura 31: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo INTA 2, animais intactos tratados com salina (via sc), pertencentes ao experimento 2, exibidas em aumentos de 50 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

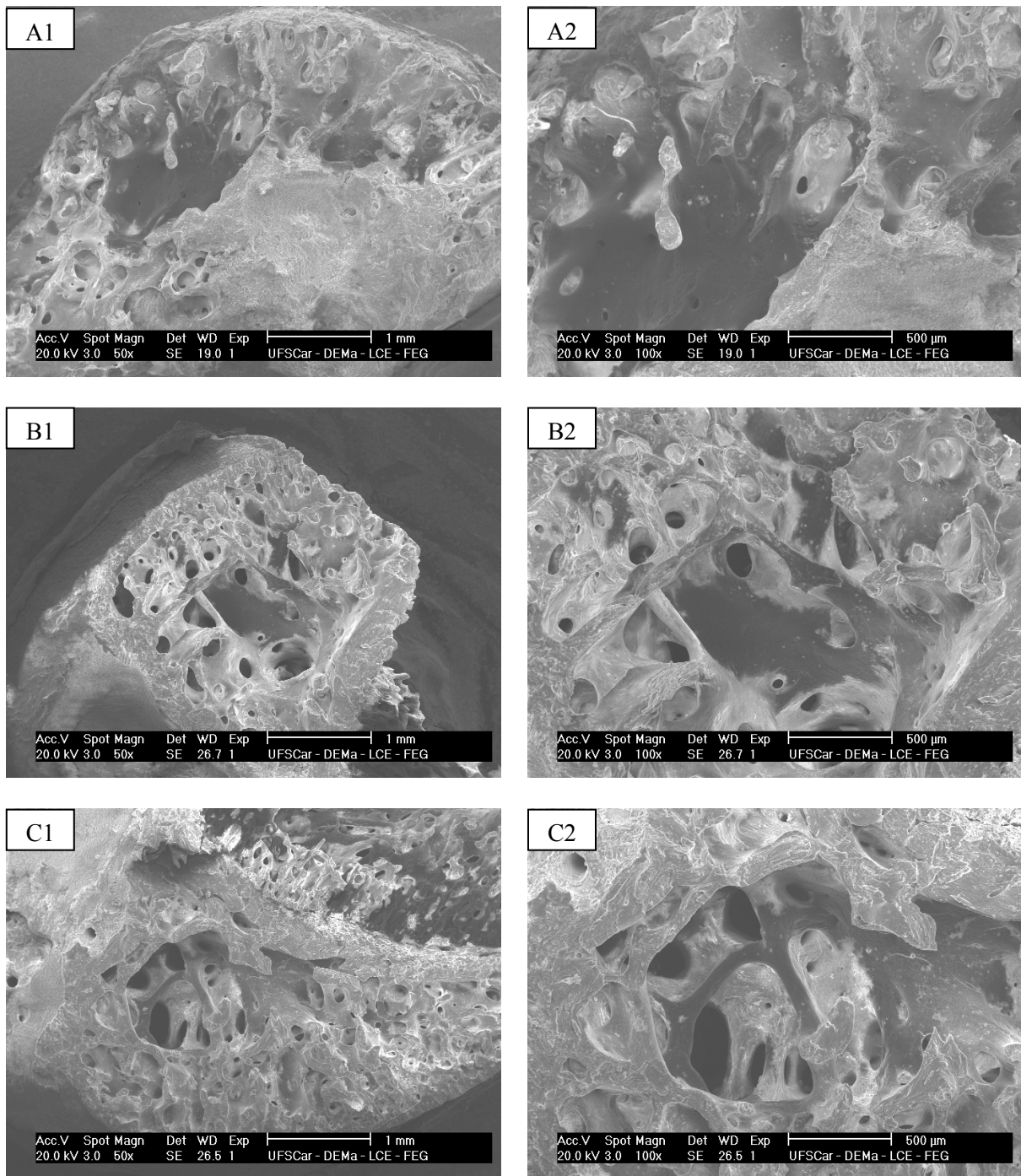


Figura 32: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX 2, animais orquiectomizados tratados com salina (via sc), pertencentes ao experimento 2, exibidas em aumentos de 50 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

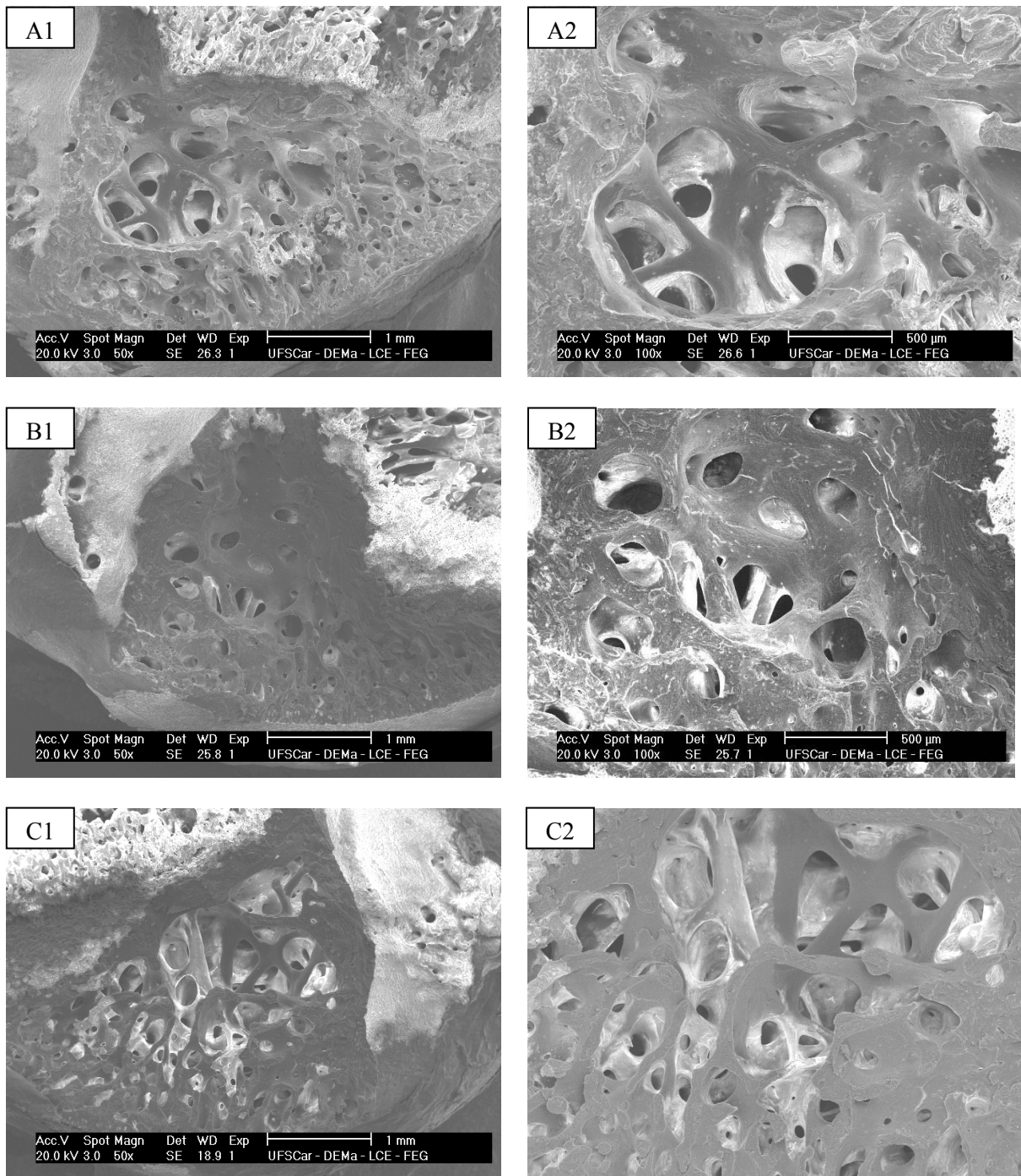


Figura 33: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX+L-NAME, animais orquiectomizados tratados com L-NAME (via sc), pertencentes ao experimento 2, exibidas em aumentos de 50 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

3.3 Experimento 3

Efeitos do tratamento com o precursor do NO, L-ARG, sobre fêmures e vértebras lombares de ratos orquiectomizados.

3.3.1 Propriedades Biométricas

Os valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) do peso corporal inicial e final e do ganho de peso corporal, dos quatro grupos de animais que compõem este experimento são mostrados na Tabela 13 e na Figura 34.

Verificou-se que não houve diferença estatística entre os pesos corporais iniciais dos diversos grupos experimentais. Verificou-se, também, que os pesos corporais finais e os ganhos de peso dos grupos ORX 3 e ORX+L-ARG foram significativamente menores quando comparados aos do grupo INTA 3.

Tabela 13: Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 3	INTA 3	ORX 3	ORX+L-ARG
n	7	8	7	8
PC inicial (g)	372,1 \pm 5,90	389,1 \pm 9,57	372,0 \pm 14,97	390,1 \pm 6,52
PC final (g)	-	448,4 \pm 8,93	396,9 \pm 17,57 ⁱ	416,0 \pm 7,98 ⁱ
Ganho de PC (g)	-	59,25 \pm 4,52	24,86 \pm 3,90 ⁱ	25,88 \pm 4,18 ⁱ

ⁱ p<0,05 vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

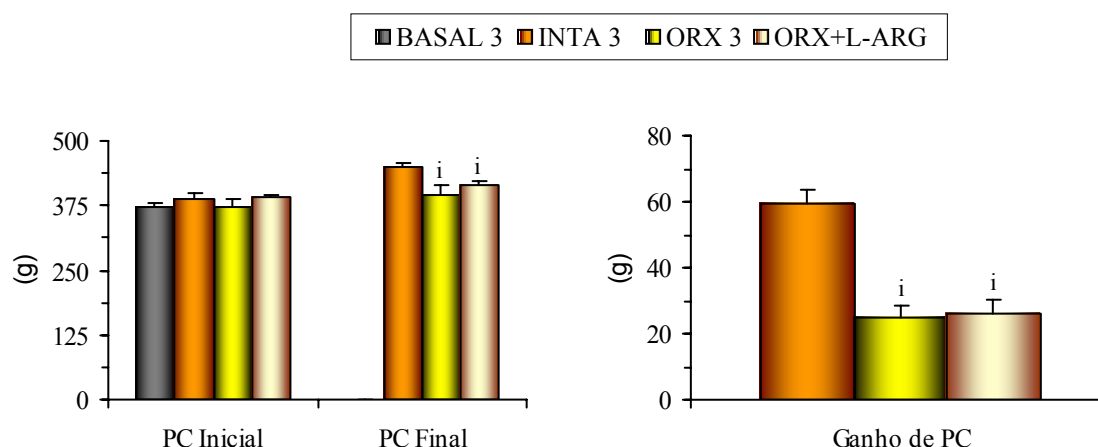


Figura 34: Peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal de ratos dos grupos que compõem o experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. ⁱ $p < 0,05$ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

Os valores referentes aos parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos dos ratos dos diferentes grupos, referentes ao experimento 3, encontram-se na Tabela 14 e nas Figuras 35 e 36. Os valores médios são expressos juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), por grupo experimental.

Observou-se que o grupo INTA 3, quando comparado ao grupo BASAL 3, apresentou um aumento significativo do comprimento ósseo, do diâmetro externo maior, da espessura da parede lateral da diáfise óssea e do momento de inércia. O grupo ORX 3, quando comparado ao grupo BASAL 3, mostrou um aumento significativo do comprimento ósseo, do diâmetro externo maior da diáfise, dos diâmetros internos maior e menor da diáfise, e do momento de inércia. Quando comparado ao grupo INTA 3, o grupo ORX 3 se mostrou estatisticamente igual em todos os parâmetros analisados. As diferenças estatísticas observadas entre os grupos ORX+L-ARG e BASAL 3 foram: aumento do comprimento ósseo, do diâmetro externo maior, dos diâmetros internos maior e menor, da espessura da parede lateral da diáfise óssea e do momento de inércia; além de diminuição da espessura da parede posterior da diáfise femoral. Com relação ao grupo INTA 3, o grupo ORX+L-ARG apresentou aumento significativo dos parâmetros: diâmetro externo maior e diâmetros internos maior e menor da diáfise óssea. Quando comparado ao grupo ORX 3, o referido grupo não apresentou diferenças significativas.

Tabela 14: Parâmetros biométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 3	INTA 3	ORX 3	ORX+L-ARG
n	7	8	7	8
L(mm)	38,21 \pm 0,24	40,86 \pm 0,42 ^b	39,62 \pm 0,33 ^b	39,81 \pm 0,41 ^b
Diâm. Externo > (mm)	4,39 \pm 0,06	4,85 \pm 0,07 ^b	4,91 \pm 0,12 ^b	5,15 \pm 0,10 ^{bi}
Diâm. Externo < (mm)	3,03 \pm 0,06	3,04 \pm 0,06	3,16 \pm 0,08	3,21 \pm 0,07
Diâm. Interno > (mm)	2,49 \pm 0,06	2,63 \pm 0,06	2,81 \pm 0,07 ^b	2,96 \pm 0,08 ^{bi}
Diâm. Interno < (mm)	1,59 \pm 0,05	1,63 \pm 0,05	1,80 \pm 0,07 ^b	1,82 \pm 0,06 ^{bi}
Espes. parede lat. (mm)	1,26 \pm 0,06	1,53 \pm 0,07 ^b	1,44 \pm 0,09	1,51 \pm 0,05 ^b
Espes. parede med. (mm)	0,64 \pm 0,02	0,70 \pm 0,03	0,66 \pm 0,02	0,68 \pm 0,02
Espes. parede ant. (mm)	0,67 \pm 0,02	0,68 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02
Espes. Parede Post. (mm)	0,77 \pm 0,02	0,74 \pm 0,02	0,71 \pm 0,01	0,70 \pm 0,00 ^b
Mom. de inércia (mm ⁴)	11,41 \pm 0,64	15,68 \pm 0,98 ^b	16,67 \pm 1,46 ^b	19,42 \pm 1,28 ^b

p<0,05: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

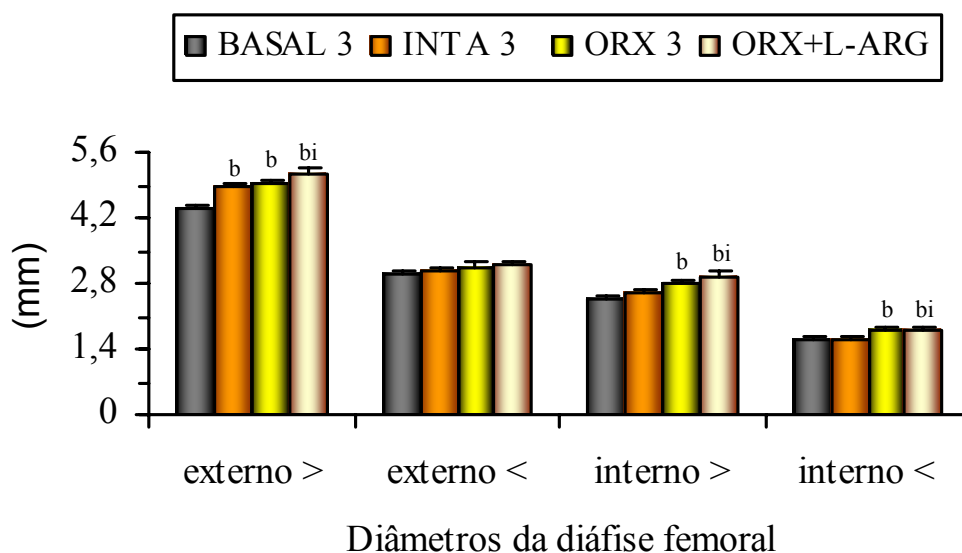


Figura 35: Diâmetros externos maior e menor, e diâmetros internos maior e menor da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. p<0,05: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

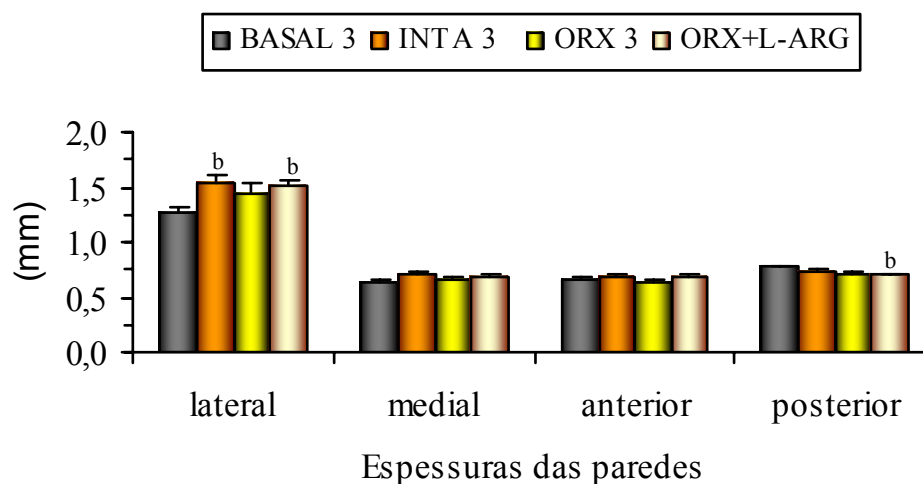


Figura 36: Espessuras das paredes lateral, medial, anterior e posterior da diáfise do fêmur esquerdo de ratos dos grupos que compõem o experimento 3. Encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3, ^x vs ORX 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

3.3.2 Propriedades Biomecânicas

Os valores referentes aos parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos, dos ratos dos diferentes grupos do experimento 3, obtidos a partir de ensaio mecânico de flexão a três pontos, estão apresentados na Tabela 15 e nas Figuras 37 e 38. Os valores médios são vistos juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) de cada grupo experimental.

O grupo INTA 3, quando comparado ao grupo BASAL 3, mostrou um aumento significativo dos parâmetros: força no limite elástico, rigidez, resiliência, força máxima, capacidade de absorver energia, força de ruptura e momento máximo. O grupo ORX 3, quando comparado ao grupo BASAL 3, apresentou força no limite elástico, força máxima e momento máximo estatisticamente maiores. Quando comparado ao grupo INTA 3, o grupo ORX 3 expressou valor médio significativamente menor da força de ruptura. O grupo ORX+L-ARG quando comparado ao grupo BASAL 3, obteve aumento significativo de: força máxima, capacidade de absorver energia, força de ruptura e momento máximo. Em relação aos grupos INTA 3 e ORX 3, o grupo ORX+L-ARG apresentou valores médios estatisticamente iguais em todos os parâmetros estudados.

Tabela 15: Parâmetros biomecânicos do fêmur direito de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos através do teste de flexão a três pontos. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 3	INTA 3	ORX 3	ORX+L-ARG
n	7	8	7	7
Força limite elástico (N)	79,75 \pm 2,73	106,8 \pm 4,99 ^b	94,29 \pm 4,12 ^b	92,53 \pm 6,41
Deform.limit.elást. (mm)	0,44 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	0,44 \pm 0,04
Rigidez (N/mm)	204,8 \pm 10,91	245,7 \pm 10,45 ^b	229,1 \pm 6,49	232,7 \pm 8,47
Resiliência (mJ)	16,79 \pm 1,19	25,05 \pm 2,24 ^b	19,64 \pm 1,63	20,69 \pm 2,72
Força máxima (N)	103,6 \pm 2,05	133,7 \pm 4,79 ^b	126,0 \pm 5,54 ^b	128,8 \pm 6,51 ^b
Deform.Forç. máx. (mm)	0,73 \pm 0,04	0,83 \pm 0,04	0,72 \pm 0,06	0,82 \pm 0,05
Capac.absor.energia (mJ)	44,71 \pm 3,62	69,14 \pm 7,71 ^b	52,34 \pm 6,74	63,16 \pm 5,94 ^b
Força de ruptura (N)	83,48 \pm 5,73	124,4 \pm 5,98 ^b	98,89 \pm 6,92 ⁱ	115,1 \pm 5,88 ^b
Deform. ruptura (mm)	1,12 \pm 0,08	1,09 \pm 0,05	1,03 \pm 0,06	1,16 \pm 0,11
Tenacidade (mJ)	80,00 \pm 5,29	102,1 \pm 9,03	87,77 \pm 8,16	105,9 \pm 14,15
Momento máx. (N.mm)	562,3 \pm 11,14	725,3 \pm 25,96 ^b	683,8 \pm 30,03 ^b	698,9 \pm 35,32 ^b

p<0,05: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

Deform.limit.elást., deformação no limite elástico; Deform. Forç. máx., deformação no ponto de força máxima; Capac.absor.energia, capacidade de absorver energia; Deform. ruptura, deformação no ponto de ruptura; máx., máximo (a).

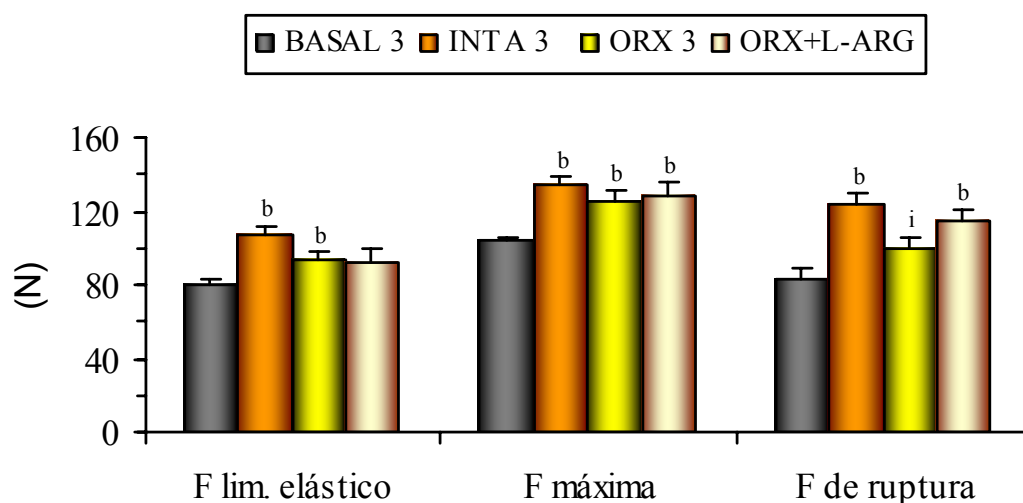


Figura 37: Valores de forças aplicadas ao fêmur direito de ratos dos grupos que compõem o experimento 3, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos. A força no limite elástico (F lim. elástico), a força máxima aplicada (F máxima) e a força no ponto de ruptura (F de ruptura) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

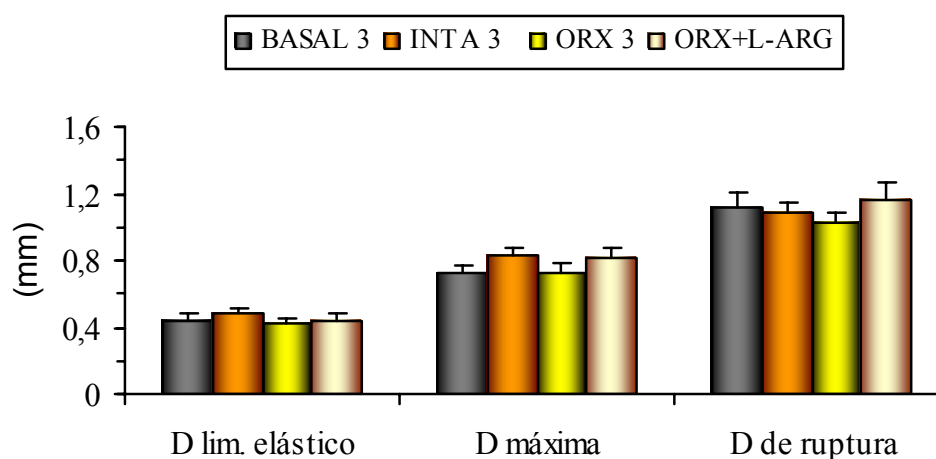


Figura 38: Deformações dos fêmures direitos de ratos dos grupos que compõem o experimento 3, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de flexão a três pontos. A deformação no limite elástico (D lim. elástico), a deformação no ponto de força máxima (D máxima) e a deformação no ponto de ruptura (D de ruptura) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

Os valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM) dos parâmetros biomecânicos, obtidos a partir de teste de compressão dos corpos vertebrais da quinta vértebra lombar, de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 3, encontram-se apresentados na Tabela 16 e nas Figuras 39 e 40.

O grupo INTA 3 apresentou um aumento significativo da força no limite elástico e uma diminuição significativa da deformação máxima, quando comparado ao grupo BASAL 3. O grupo ORX 3 se mostrou estatisticamente igual ao grupo BASAL 3; além de estatisticamente menor do que o grupo INTA 3, com relação aos parâmetros: força no limite elástico, capacidade de absorver energia e força máxima. O grupo ORX+L-ARG obteve força no limite elástico estatisticamente maior do que o grupo BASAL 3. Quando comparado ao grupo INTA 3, o grupo ORX+L-ARG apresentou valores significativamente menores dos parâmetros: força no limite elástico e força máxima. Com relação ao grupo ORX 3, o grupo ORX+L-ARG apresentou um aumento significativo da deformação no limite elástico e da capacidade de absorver energia.

Tabela 16: Parâmetros biomecânicos de corpos vertebrais da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos a partir de teste de compressão. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 3	INTA 3	ORX 3	ORX+L-ARG
n	7	7	7	8
Força limite elástico (N)	135,0 \pm 7,65	205,5 \pm 9,92 ^b	167,5 \pm 10,44 ⁱ	176,2 \pm 2,50 ^{bi}
Deform. limite elást. (mm)	0,41 \pm 0,07	0,39 \pm 0,03	0,30 \pm 0,03	0,39 \pm 0,01 ^x
Rigidez (N/mm)	670,0 \pm 130,1	655,5 \pm 44,04	798,2 \pm 104,2	607,8 \pm 33,94
Capac. absorv. energ. (mJ)	36,64 \pm 8,67	47,54 \pm 5,85	30,73 \pm 4,08 ⁱ	42,33 \pm 1,43 ^x
Força Máxima (N)	175,6 \pm 13,56	211,1 \pm 11,26	173,8 \pm 9,91 ⁱ	180,0 \pm 2,37 ⁱ
Deformação Máx. (mm)	2,93 \pm 0,46	0,42 \pm 0,05 ^b	1,20 \pm 0,61	1,15 \pm 0,51
Tenacidade (Mpa)	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00

p<0,05: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3, ^x vs ORX 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

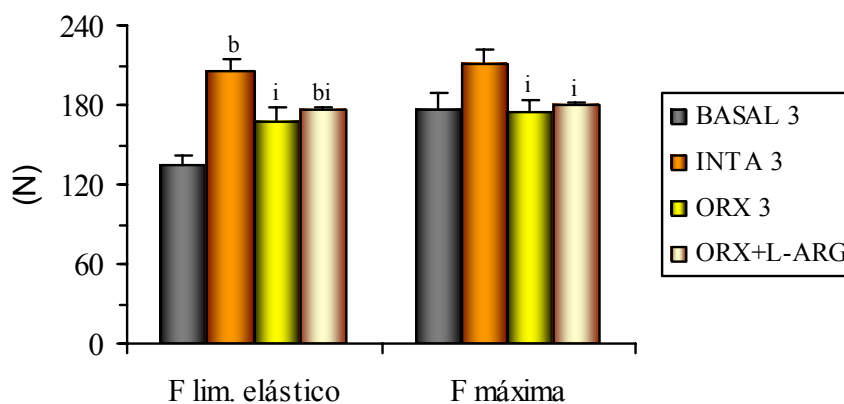


Figura 39: Valores de forças aplicadas ao corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos que compõem o experimento 3, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão. A força no limite elástico (F lim. elástico) e a força máxima aplicada (F máxima) encontram-se expressas em valores médios juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3, ^x vs ORX 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

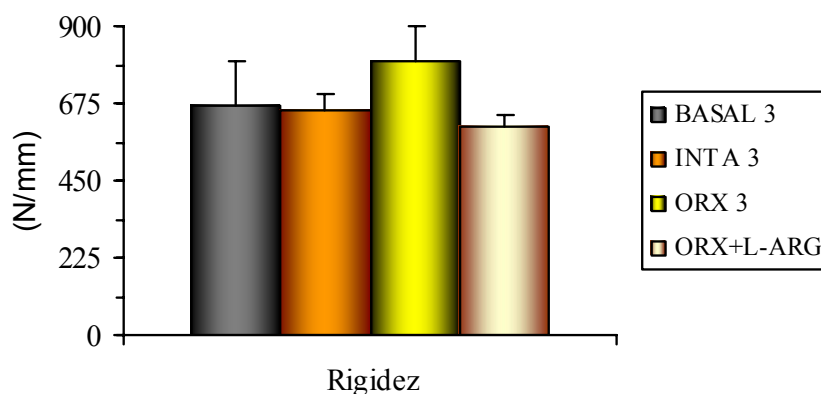


Figura 40: Valores de rigidez do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 2, extraídos da curva força-deformação obtida durante ensaio biomecânico de compressão. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

3.3.3 Densitometria Óssea do Fêmur Esquerdo e da Sexta Vértebra Lombar

Os valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD), do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6), de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 3, obtidas através de densitometria de duplo fóton, podem ser observadas na Tabela 17 e na Figura 41.

Com relação ao FE, verificou-se que todos os parâmetros densitométricos do grupo INTA 3 foram estatisticamente maiores do que os do grupo BASAL 3. O grupo ORX 3, quando comparado ao grupo BASAL 3, apresentou aumento significativo dos parâmetros: BMD do FE total; BMC e BMD do terço distal; e BMD do terço médio do FE. Quando comparado ao grupo INTA 3, o grupo ORX 3 mostrou uma redução significativa da BMD do terço proximal do FE. O grupo ORX+L-ARG, quando comparado ao grupo BASAL 3 expressou um aumento significativo dos valores médios de todos os parâmetros densitométricos. Quando comparado ao grupo INTA 3, o grupo ORX+L-ARG apresentou diminuição significativa de: BMD do FE total, BMD dos terços distal e proximal do FE. Em relação ao grupo ORX 3, o grupo ORX+L-ARG apresentou valores médios estatisticamente iguais em todos os parâmetros analisados.

Na análise da VL6, observou-se que o grupo INTA 3 evidenciou valores médios estatisticamente maiores, em todos os parâmetros estudados, quando comparado ao grupo BASAL 3. O grupo ORX 3 não apresentou diferenças estatísticas com relação aos grupos BASAL 3 e INTA 3. O grupo ORX+L-ARG apresentou aumento significativo dos parâmetros BMC e BA quando comparado ao grupo BASAL 3, e não apresentou diferenças estatísticas com relação aos grupos INTA 3 e ORX 3.

Tabela 17: Valores de conteúdo mineral ósseo (BMC), de área óssea (BA) e de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 3	INTA 3	ORX 3	ORX+L-ARG
n	7	8	7	8
BMC (g) FE total	0,38 \pm 0,010	0,48 \pm 0,012 ^b	0,44 \pm 0,022	0,45 \pm 0,016 ^b
BA (cm ²) FE total	2,45 \pm 0,045	2,68 \pm 0,043 ^b	2,61 \pm 0,067	2,67 \pm 0,065 ^b
BMD (g/cm ²) FE total	0,15 \pm 0,002	0,18 \pm 0,002 ^b	0,17 \pm 0,004 ^b	0,17 \pm 0,003 ^{bi}
BMC (g) 1/3 distal FE	0,13 \pm 0,003	0,17 \pm 0,004 ^b	0,16 \pm 0,008 ^b	0,16 \pm 0,006 ^b
BA (cm ²) 1/3 distal FE	0,88 \pm 0,015	0,94 \pm 0,012 ^b	0,92 \pm 0,024	0,95 \pm 0,022 ^b
BMD(g/cm ²) 1/3 distal FE	0,15 \pm 0,002	0,18 \pm 0,003 ^b	0,17 \pm 0,005 ^b	0,17 \pm 0,003 ^{bi}
BMC (g) 1/3 médio FE	0,10 \pm 0,004	0,14 \pm 0,003 ^b	0,13 \pm 0,007	0,13 \pm 0,005 ^b
BA (cm ²) 1/3 médio FE	0,68 \pm 0,011	0,77 \pm 0,015 ^b	0,75 \pm 0,021	0,76 \pm 0,020 ^b
BMD(g/cm ²)1/3 médio FE	0,15 \pm 0,003	0,18 \pm 0,003 ^b	0,17 \pm 0,005 ^b	0,17 \pm 0,004 ^b
BMC (g) 1/3 prox. FE	0,14 \pm 0,004	0,18 \pm 0,006 ^b	0,16 \pm 0,007	0,17 \pm 0,006 ^b
BA (cm ²) 1/3 prox. FE	0,89 \pm 0,018	0,97 \pm 0,020 ^b	0,94 \pm 0,021	0,97 \pm 0,023 ^b
BMD(g/cm ²) 1/3 prox. FE	0,16 \pm 0,003	0,18 \pm 0,003 ^b	0,17 \pm 0,004 ⁱ	0,17 \pm 0,003 ^{bi}
BMC (g) VL6	0,087 \pm 0,004	0,115 \pm 0,004 ^b	0,099 \pm 0,006	0,105 \pm 0,005 ^b
BA (cm ²) VL6	0,99 \pm 0,024	1,16 \pm 0,019 ^b	1,09 \pm 0,039	1,12 \pm 0,031 ^b
BMD (g/cm ²) VL6	0,088 \pm 0,002	0,098 \pm 0,002 ^b	0,090 \pm 0,003	0,094 \pm 0,002

p<0,05: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

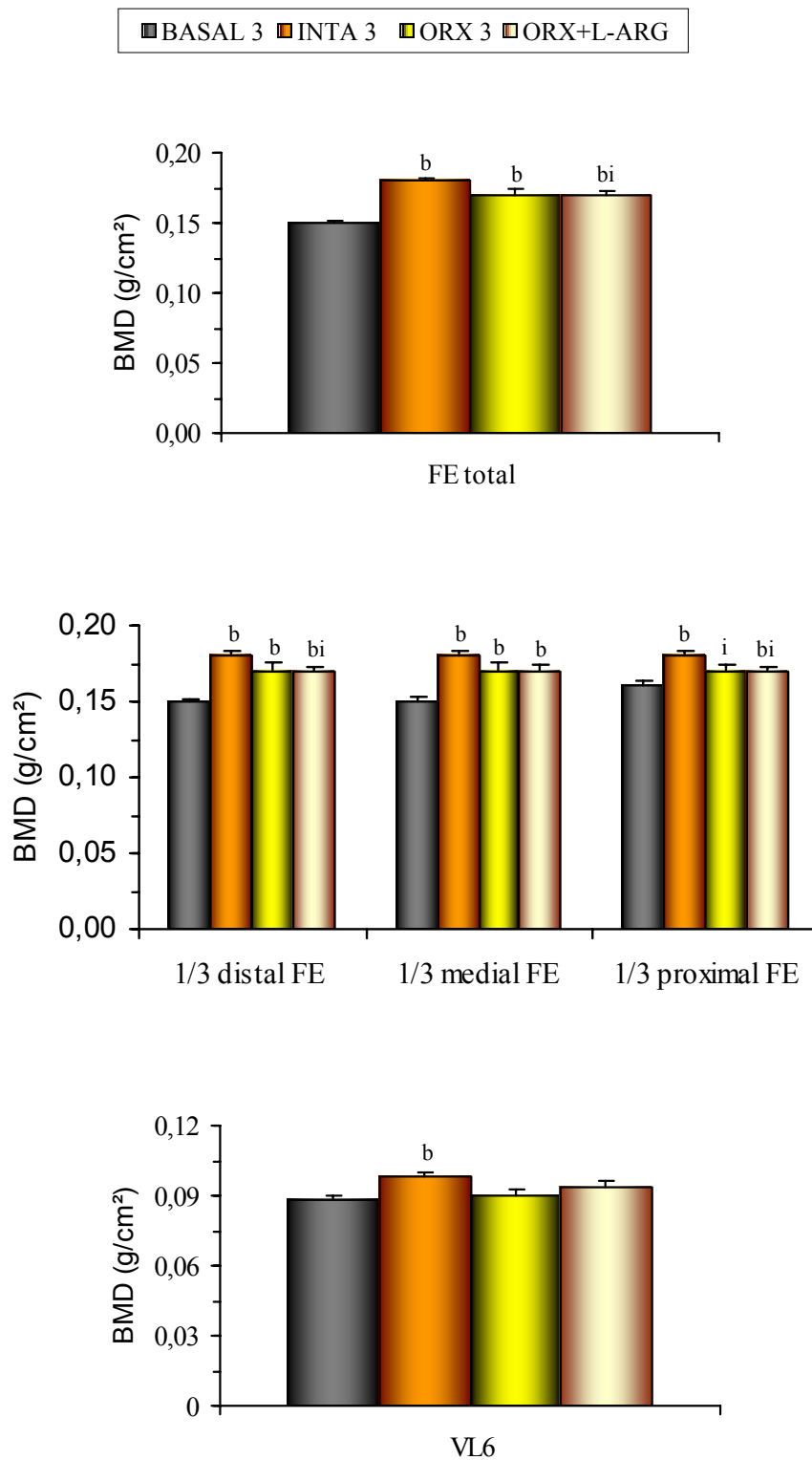


Figura 41: Valores de densidade mineral óssea (BMD) do fêmur esquerdo (FE) total e fracionado nos terços: distal, médio e proximal, e da sexta vértebra lombar (VL6) de ratos dos grupos referentes ao experimento 3, obtidos através de densitometria de duplo fóton. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

3.3.4 Propriedades Físicas do Corpo Vertebral

Os valores médios dos parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar (VL5) de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 3, estão apresentados na Tabela 18 e nas Figuras 42 e 43.

Tabela 18: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em valores médios juntamente com o erro padrão da média (Média \pm EPM), de cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	BASAL 3	INTA 3	ORX 3	ORX+L-ARG
n	7	7	7	8
Altura (mm)	6,39 \pm 0,17	7,23 \pm 0,10 ^b	6,56 \pm 0,25 ⁱ	6,79 \pm 0,14 ^{bi}
Peso do osso imerso (g)	0,02 \pm 0,001	0,04 \pm 0,002 ^b	0,03 \pm 0,002	0,03 \pm 0,001 ^b
Peso do osso úmido (g)	0,10 \pm 0,005	0,12 \pm 0,004 ^b	0,11 \pm 0,009	0,11 \pm 0,004
Peso do osso seco (g)	0,05 \pm 0,002	0,07 \pm 0,003 ^b	0,05 \pm 0,004	0,06 \pm 0,002 ^b
Peso das cinzas (g)	0,03 \pm 0,001	0,04 \pm 0,002 ^b	0,03 \pm 0,003	0,04 \pm 0,001 ^b
Volume Ósseo (cm ³)	0,08 \pm 0,004	0,09 \pm 0,003	0,08 \pm 0,007	0,08 \pm 0,003
Dens. Óssea (g/cm ³)	1,33 \pm 0,010	1,40 \pm 0,008 ^b	1,37 \pm 0,010 ^b	1,39 \pm 0,008 ^b
Dens. Óssea/100g de PC	0,36 \pm 0,006	0,32 \pm 0,006 ^b	0,35 \pm 0,016	0,33 \pm 0,007 ^b
Dens. Mineral (g/cm ³)	0,39 \pm 0,012	0,46 \pm 0,011 ^b	0,41 \pm 0,012 ⁱ	0,44 \pm 0,008 ^b
Dens. Min./100g de PC	0,10 \pm 0,003	0,10 \pm 0,001	0,11 \pm 0,006	0,11 \pm 0,003
% Ósseo de Água	51,72 \pm 0,98	47,45 \pm 0,71 ^b	49,80 \pm 0,86	48,88 \pm 0,57 ^b
% Material Orgânico	19,30 \pm 0,34	19,89 \pm 0,19	20,01 \pm 0,35	19,60 \pm 0,27
% Material Mineral	28,98 \pm 0,64	32,67 \pm 0,59 ^b	30,19 \pm 0,65 ⁱ	31,52 \pm 0,38 ^b
Área de Sec. Trans.(mm ²)	11,88 \pm 0,34	12,28 \pm 0,26	12,03 \pm 0,61	12,13 \pm 0,29

p<0,05: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

Os parâmetros físicos do corpo vertebral do grupo INTA 3, quando comparados aos do grupo BASAL 3, mostraram um aumento significativo de: altura, peso imerso, peso úmido, peso seco, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral óssea, percentual ósseo de material mineral; além de uma diminuição significativa do percentual ósseo de água. O grupo ORX 3 apresentou aumento significativo da densidade óssea quando comparado ao grupo BASAL 3, e diminuição significativa da altura, densidade mineral óssea

e percentual ósseo de material mineral, quando comparado ao grupo INTA 3. O grupo ORX+L-ARG, quando comparado ao grupo BASAL 3, mostrou um aumento significativo dos parâmetros: altura, peso imerso, peso seco, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral óssea e percentual de material mineral; sendo estatisticamente menor com relação ao percentual ósseo de água. Com relação ao grupo INTA 3, observou-se que o grupo ORX+L-ARG apresentou uma diminuição significativa apenas da altura, sendo estatisticamente igual em relação aos demais parâmetros. Quando comparado ao grupo ORX 3, o grupo ORX+L-ARG não apresentou diferenças estatísticas com relação a nenhum dos parâmetros estudados neste item.

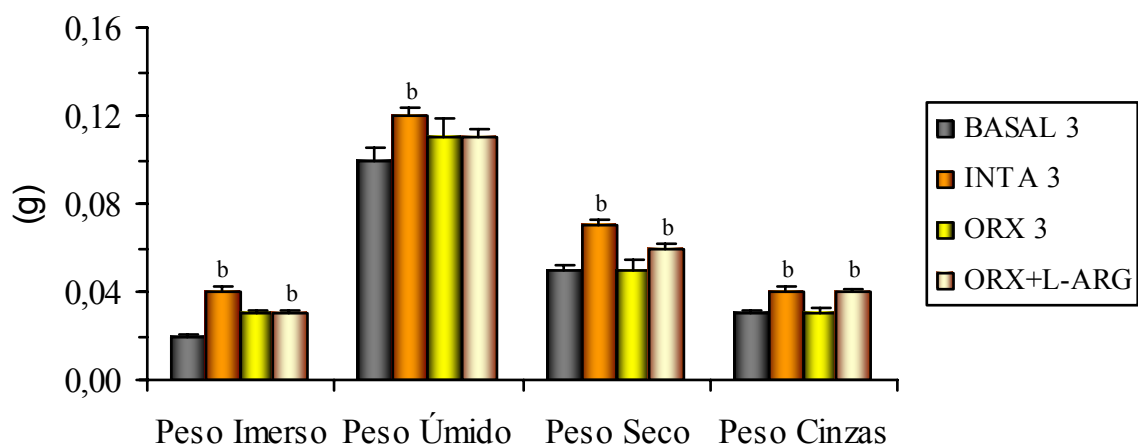


Figura 42: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: peso do osso imerso, peso do osso úmido, peso do osso desidratado e peso das cinzas ósseas de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. ^b $p < 0,05$ vs BASAL 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

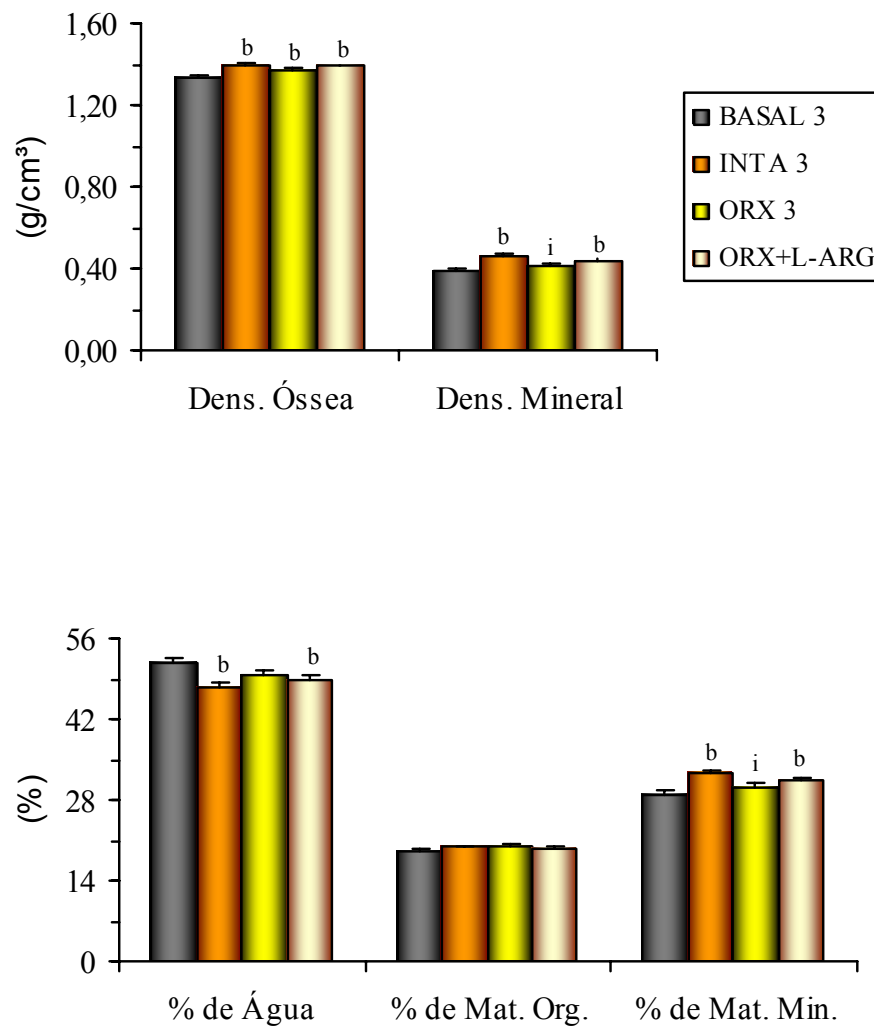


Figura 43: Parâmetros físicos do corpo vertebral da quinta vértebra lombar: densidade óssea, densidade mineral óssea, percentuais ósseos de água, de material orgânico e de material mineral de ratos dos grupos referentes ao experimento 3. Encontram-se expressos em média juntamente com o erro padrão da média de cada grupo experimental. $p < 0,05$: ^b vs BASAL 3, ⁱ vs INTA 3. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

3.3.5 Análise da Superfície Óssea Trabecular Femoral por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura das epífises distais dos fêmures esquerdos, de ratos dos diferentes grupos que compõem o experimento 3, podem ser vistas nas Figuras 44, 45, 46, 47 e 48.

As micrografias dos grupos ORX 3 e ORX+L-ARG, quando comparadas as dos grupos de animais intactos apresentam escavações marcantes, espaços maiores e perda de conectividade entre as trabéculas. Portanto, não são observadas diferenças aparentes entre os dois grupos.

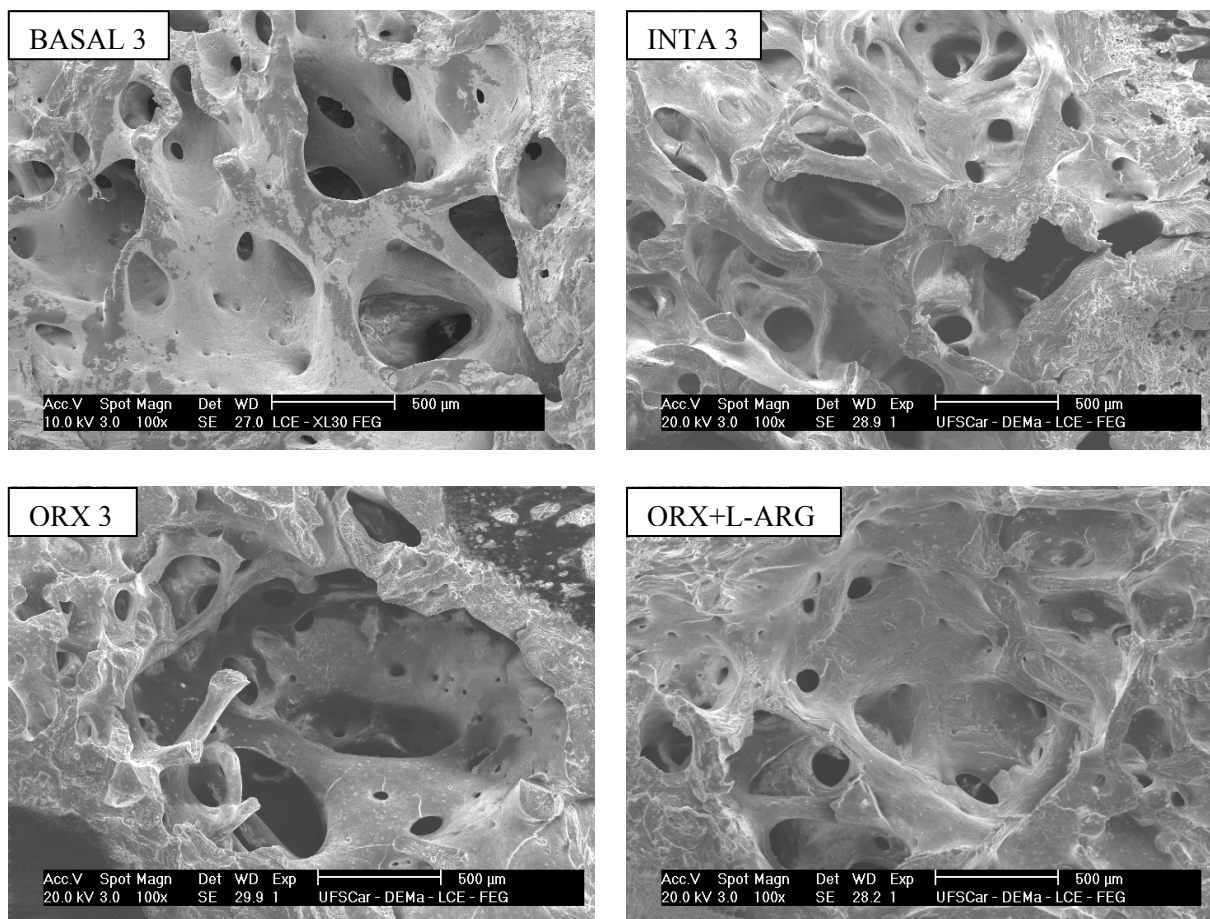


Figura 44: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur, de um exemplar de cada grupo que compõe o experimento 3, exibidas em aumento de 100 vezes. BASAL 3, animais sacrificados aos quatro meses de idade; INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip); ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip); ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip).

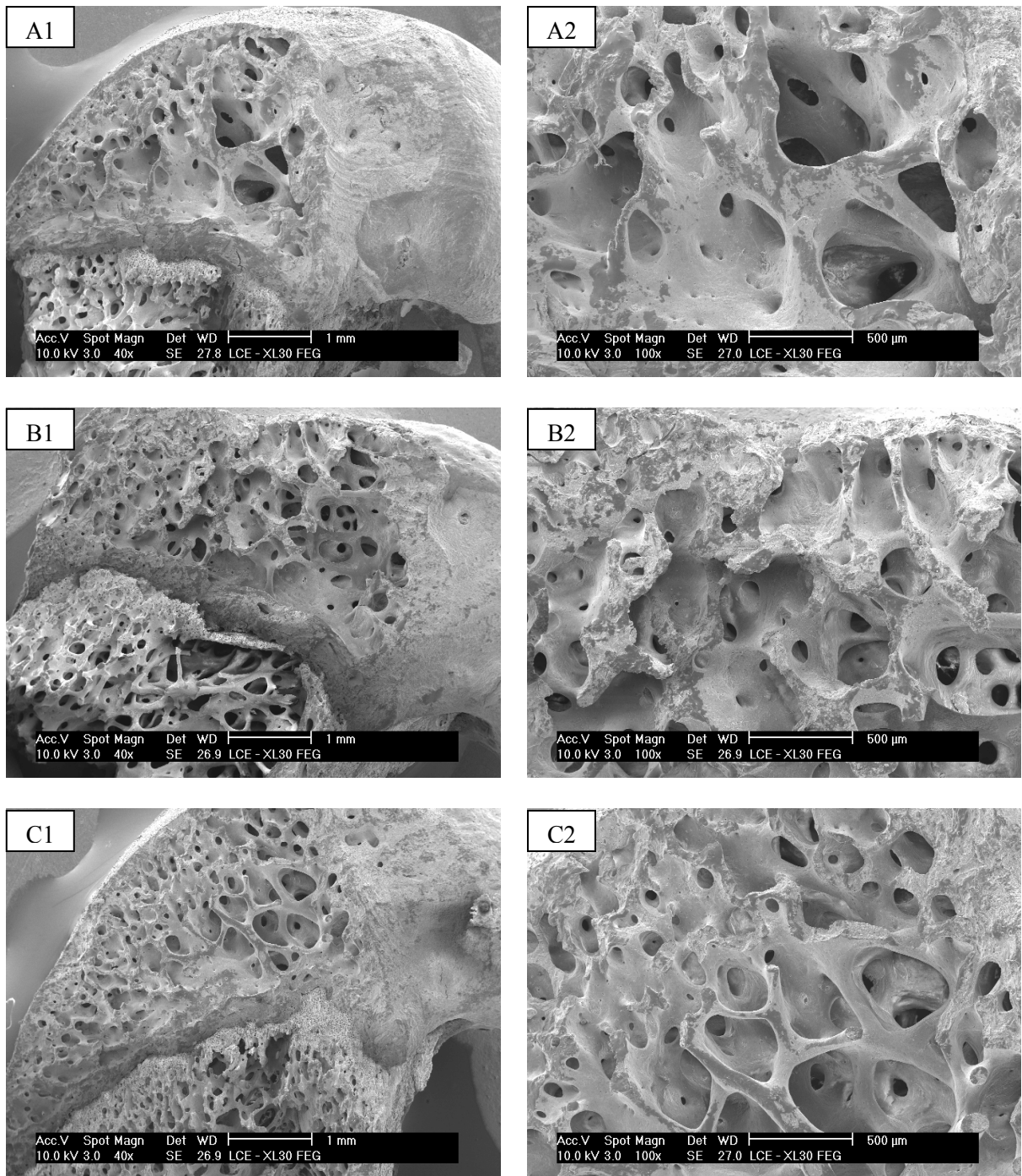


Figura 45: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo BASAL 3, grupo de animais sacrificados no início do experimento. Exibidas utilizando-se aumentos de 40 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

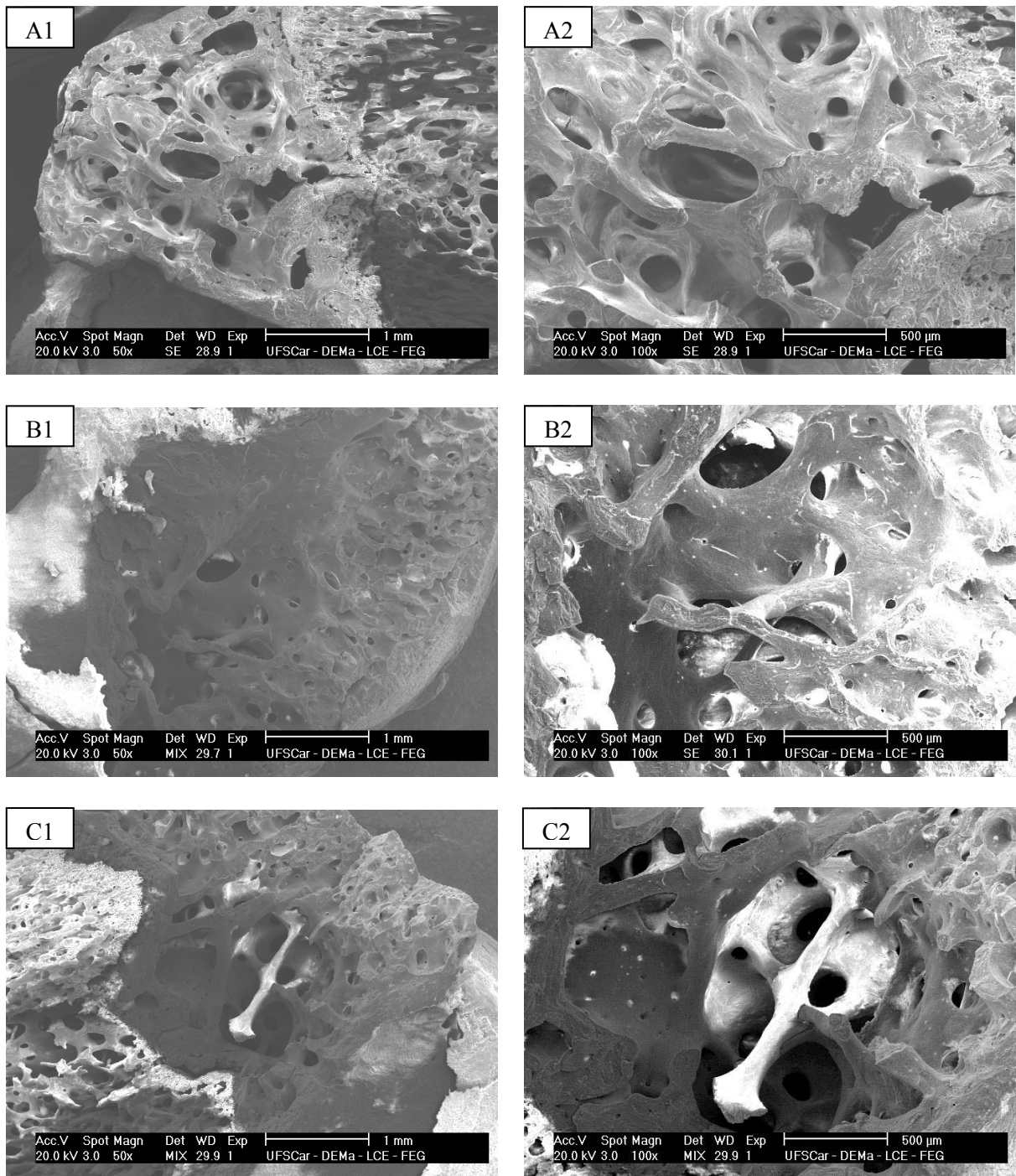


Figura 46: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo INTA 3, animais intactos tratados com salina (via ip), pertencentes ao experimento 3, exibidas em aumentos de 50 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

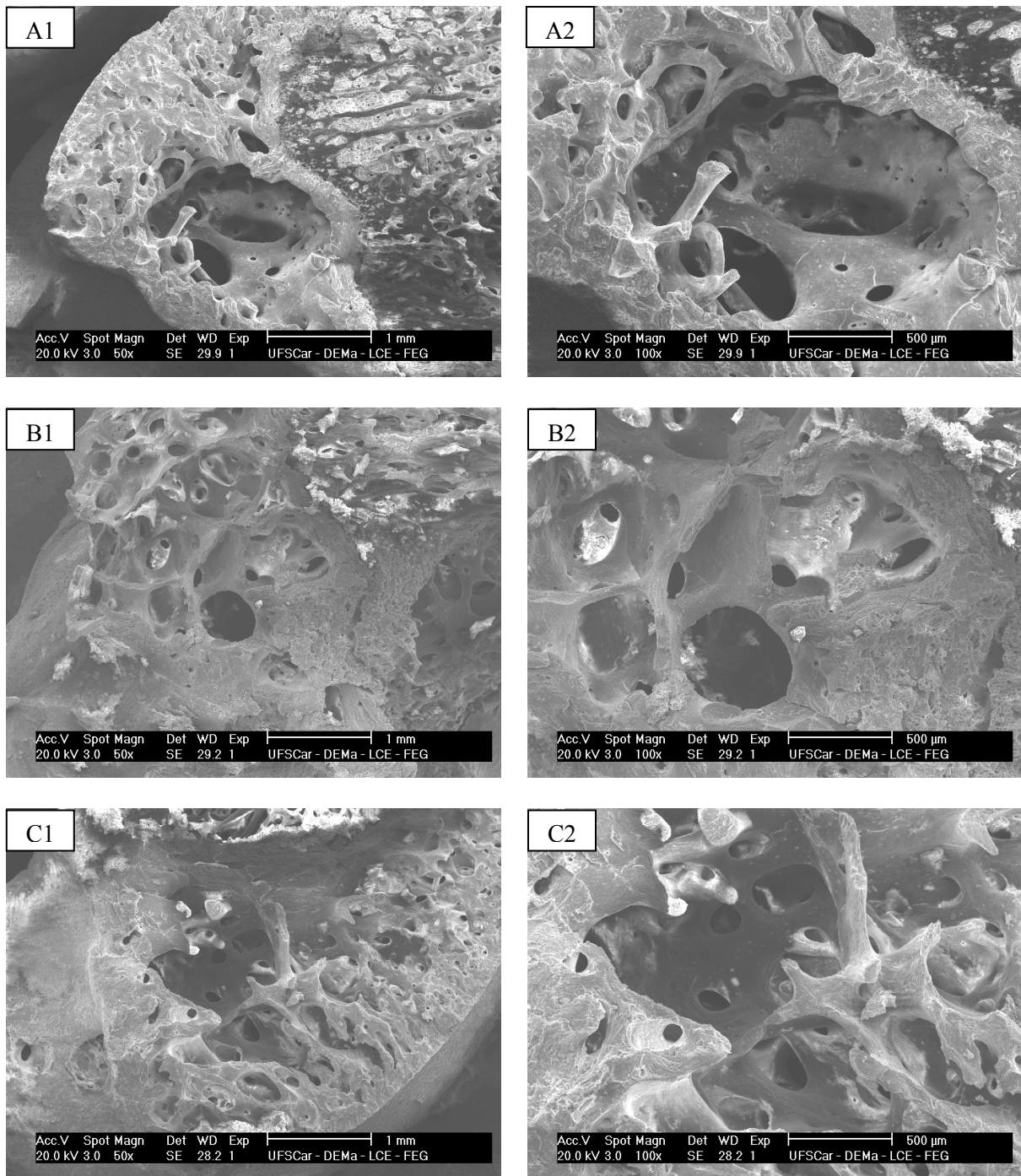


Figura 47: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX 3, animais orquiectomizados tratados com salina (via ip), pertencentes ao experimento 3, exibidas em aumentos de 50 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

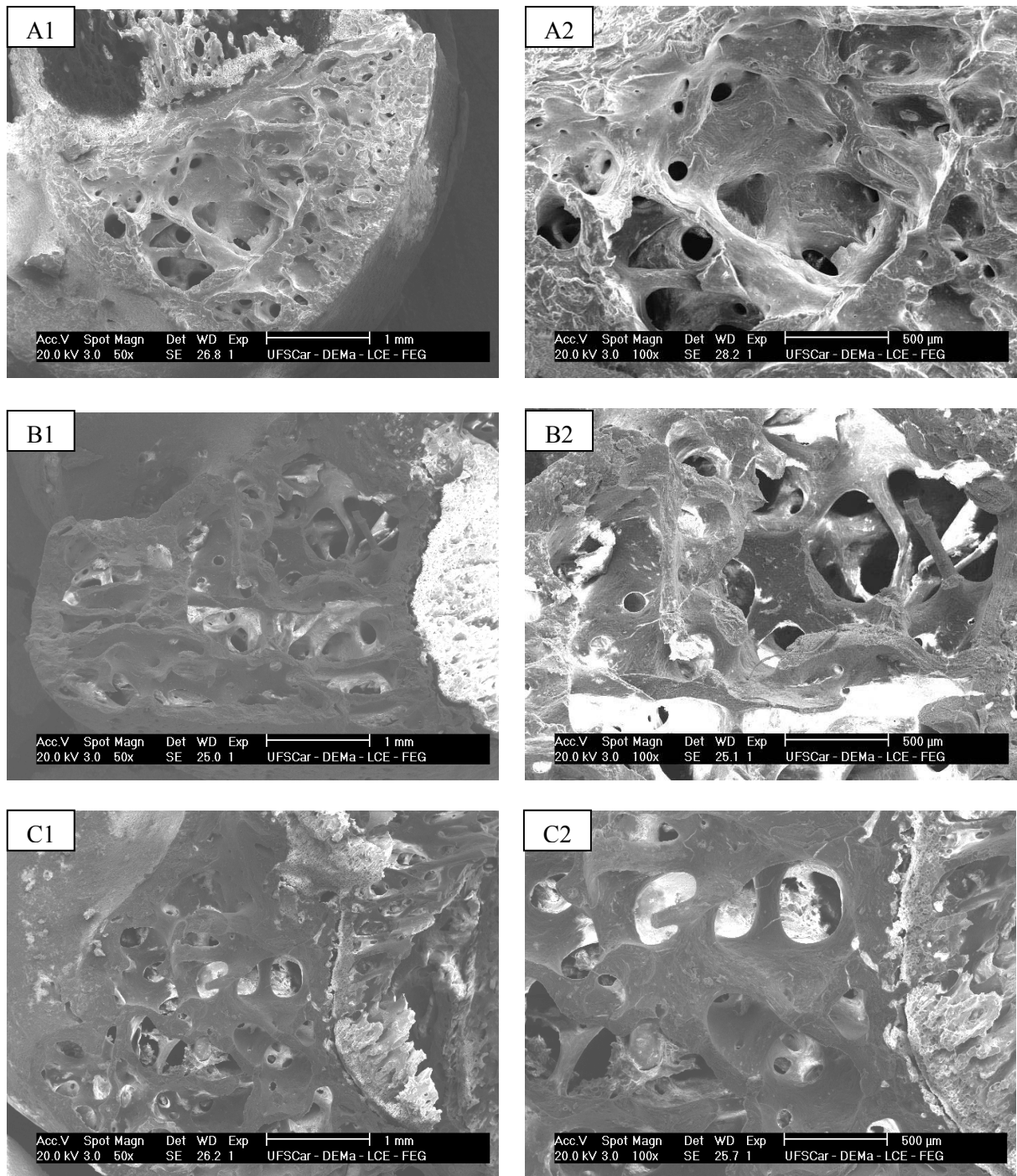


Figura 48: Micrografias eletrônicas de varredura da epífise distal do fêmur de três exemplares do grupo ORX+L-ARG, animais orquiectomizados tratados com L-arginina (via ip), pertencentes ao experimento 3, exibidas em aumentos de 50 vezes (A1, B1, C1) e 100 vezes (A2, B2, C2), respectivamente.

4 DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

Neste experimento, os ratos orquiectomizados tratados com o doador de NO, ISDN, apresentaram ganho de peso semelhante ao dos ratos intactos. Diversos estudos têm demonstrado que a orquiectomia, ao contrário da ovariectomia, provoca redução significativa do ganho de PC (PENG et al., 1994; MILLER; BROWMAN; JEE, 1995; BERTONCELLO, 2001). Este efeito catabólico da castração, observado também nos animais ORX tratados com salina neste estudo, foi prevenido pelo tratamento com ISDN. Além disso, o aumento do ganho de peso resultante de TRH comentado por Wimalawansa (2000b), não foi observado no tratamento com ISDN. O fato de não haver diferença de ganho de peso corporal entre os animais intactos e ORX tratados com ISDN, parece indicar que atuação do NO como mediador de hormônios sexuais pode ir além do tecido ósseo e que pelo menos um dos efeitos adversos da TRH não é observado neste tratamento.

A análise do efeito do ISDN sobre os fêmures dos animais, indica que esta substância foi capaz de prevenir o aumento da cavidade medular da diáfise femoral, bem como a diminuição da espessura de suas paredes. Estes efeitos característicos da deficiência de hormônios androgênicos são resultantes da perda de massa óssea cortical, na diáfise de ossos longos, e tem como consequência o aumento do risco de fraturas (DANIELSEN; MOSEKILDE; ANDREASSEN, 1992; GUNNESS; ORWOLL, 1995).

Os resultados densitométricos do fêmur vêm corroborar os achados anteriores. A BMD do fêmur total e a do terço médio e distal do fêmur dos animais ORX tratados com ISDN foram maiores do que aquelas observadas no grupo ORX tratado com salina, e estatisticamente iguais aos dos animais intactos. Vale lembrar, que os ratos são animais quadrúpedes e, portanto, o peso de seu corpo fica distribuído entre suas quatro patas. Isso possibilita inferir sobre os ossos longos através da análise do fêmur ou da tíbia. Sendo os ossos longos os possuidores de maior quantidade de osso cortical, parece ficar caracterizado o efeito preventivo deste doador de NO sobre a perda de massa óssea cortical, induzida pela orquiectomia. Além disso, já que a osteopenia e a osteoporose são definidas com base na massa óssea (KANIS et al., 1994; PINTO NETO et al., 2002), e que as fraturas resultam de uma baixa quantidade de massa óssea (SCHÖNAU, 2004), estes dados sugerem que o

tratamento com ISDN pode ser eficiente na prevenção da osteopenia e talvez, do risco de fraturas.

De acordo com Melton et al. (1986) as propriedades biomecânicas correspondem, provavelmente, aos parâmetros mais importantes referentes ao risco de fraturas, que é o efeito clínico de maior relevância na osteoporose. Para Peng et al. (1994), embora a osteopenia em ratos não leve a fraturas, é possível avaliar a resistência mecânica e, conseqüentemente, a qualidade óssea dos animais estudados, através destes parâmetros. Einhorn (1996) lembra ainda que, quando ossos inteiros são submetidos a condições de cargas experimentais ou fisiológicas, seus comportamentos mecânicos são dependentes não somente da massa do tecido e de suas propriedades materiais, mas também, de sua geometria e arquitetura. Portanto, os resultados provenientes do teste de flexão a três pontos do fêmur inteiro, é um bom indicativo da qualidade global deste osso, sendo a inclusão desta análise indispensável na discussão referente ao risco de fratura deste.

Neste experimento, a análise das propriedades biomecânicas mostrou que o período de oito semanas foi suficiente para que os efeitos danosos da castração ocorressem em uma grande dimensão, tanto na fase elástica quanto na fase plástica. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros dos animais ORX tratados com o doador de NO durante o mesmo período de tempo, e aqueles apresentados pelos animais intactos. Isso indica, que os efeitos benéficos do tratamento com ISDN, observados por meio dos parâmetros biométricos e densitométricos, refletiram-se sobre a biomecânica óssea. Conseqüentemente, o tratamento com ISDN foi capaz de prevenir os efeitos deletérios da castração sobre o osso cortical, protegendo-o do risco de fraturas. Considerando que um fármaco somente é visto como eficaz para o tratamento da osteoporose, se reduzir os riscos de fraturas (WIMALAWANSA 2000b), o doador de NO ISDN parece atender a esse preceito no que se refere a osso cortical.

Outra observação a ser considerada neste estudo, com relação às propriedades biomecânicas do fêmur, é que os parâmetros correspondentes às áreas sob a curva que incluem também a fase plástica (capacidade de absorver energia e tenacidade), que é a fase não linear da curva, parecem não oferecer informações consistentes para avaliação dos resultados. O osso é um material biológico que apresenta características de materiais dúcteis e de materiais frágeis. Isso faz com que as curvas experimentais apresentem uma força máxima elevada gerando uma pequena deformação (ex.: para animais intactos), ou uma força relativamente mais baixa gerando uma maior deformação (ex.: para animais ORX tratados com salina). Assim sendo, as duas situações resultaram em valores similares, embora

representem informações adversas no contexto estudado. Tanto que, em alguns trabalhos encontrados na literatura (NORDSLETTEN et al., 1994; SØGAARD et al., 1994; SØGAARD et al., 1997), os referidos parâmetros mostram-se incoerentes com os demais.

A inclusão do grupo BASAL neste estudo serve como linha de base para a análise das condições ósseas dos animais aos quatro meses de idade, fase inicial do experimento (KALU, 1991). Portanto, a comparação entre as variáveis apresentadas por este grupo e aquelas apresentadas pelo grupo ORX tratado com salina, possibilita a observação da extensão dos efeitos promovidos pela deficiência de hormônios gonádicos durante o período estudado. Tal comparação mostrou que a castração parece não abolir o aumento de parâmetros como: comprimento do fêmur, diâmetros maiores da diáfise femoral, momento de inércia, força máxima e BMD do terço médio do fêmur. Porém, a deficiência androgênica além de tornar os aumentos das referidas variáveis significativamente menores do que aqueles observados no grupo intacto, causou estabilização ou redução dos demais parâmetros estudados no osso cortical. Estes resultados confirmam também a eficiência do processo de castração verificada logo após o sacrifício dos animais através da atrofia das glândulas seminais e prostática.

A avaliação do efeito do ISDN sobre as alterações induzidas pela deficiência de hormônios gonádicos sobre o osso trabecular, foi realizada através de análises da quinta e sexta vértebras lombares, e das epífises proximal e distal do fêmur. Onde, a análise da BMD obtida por densitometria de duplo fóton, em três regiões de prevalência de massa óssea trabecular: sexta vértebra lombar, terço proximal e terço distal do fêmur, mostrou que o ISDN preveniu a perda de massa óssea apenas no terço distal do fêmur.

Porém, a análise da composição óssea, e das densidades óssea e mineral do corpo da VL5 calculadas com base no princípio de Arquimedes, indicam que o tratamento com ISDN minimizou a perda de massa óssea e de material mineral causada pela ORX. Esta observação baseia-se no fato da massa óssea dos animais ORX tratados com ISDN se encontrar em condições melhores do que aquela apresentada pelo grupo ORX tratado com salina, embora não se encontre no mesmo patamar do grupo intacto. Este dado é relevante uma vez que a obtenção da BMD calculada com base no princípio de Arquimedes (“densidade física”) vem sendo considerada uma medida mais fidedigna e mais sensível do que a BMD resultante da densitometria de duplo fóton (“densidade de área”), principalmente quando se trata de ossos pequenos, já que as dimensões do osso interfere na confiabilidade do resultado (SCHÖNAU, 2004). Além disso, os animais ORX apresentaram uma maior área de secção transversa do corpo da VL5 quando comparados aos animais intactos. Este fato já

havia sido constatado em outros trabalhos (KIEBZAK et al., 1988; NORDSLETTEN et al., 1994; MONTEAGUDO et al., 1997), e parece decorrer da influência que a castração exerce sobre a composição óssea (perda de materiais minerais e orgânicos compensada por aumento do percentual de água), resultando em aumento do volume ósseo que é diretamente proporcional à área de secção transversa. De modo que alguns pesquisadores dividem a força máxima obtida no teste biomecânico de compressão pela área de secção transversa vertebral, tendo assim, uma força máxima normalizada (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; SØGAARD et al., 1995).

A análise dos parâmetros biomecânicos vertebrais indica que o tratamento com ISDN não evitou que a orquiectomia promovesse a diminuição das forças que os espécimes são capazes de suportar tanto na fase elástica quanto na fase plástica da curva. A capacidade vertebral de suportar esforços dos animais que receberam doador de NO mostrou-se menor do que a dos animais intactos. Porém, o tratamento com ISDN foi capaz de prevenir a diminuição da rigidez óssea, que corresponde à capacidade do tecido ósseo em resistir a deformações permanentes. Estes dados sugerem que o tratamento com ISDN exerceu um efeito preventivo apenas parcial sobre as propriedades biomecânicas do osso trabecular.

A microscopia eletrônica de varredura da massa óssea trabecular fornece indicativos qualitativos da arquitetura óssea. A análise das fotomicrografias dos animais orquiectomizados tratados com ISDN parece reforçar o que foi indicado pelos resultados quantitativos. Nestes animais, o tecido ósseo da porção média dos côndilos femorais parece apresentar um maior espaçamento entre as trabéculas e uma menor quantidade de platôs trabeculares, quando comparado ao dos animais intactos. Curiosamente, os resultados densitométricos desta mesma região do fêmur mostraram um efeito preventivo do ISDN sobre os efeitos danosos da orquiectomia.

A avaliação geral do efeito do ISDN sobre as alterações induzidas pela deficiência de hormônios gonádicos no osso trabecular mostra uma proteção menos expressiva do que aquela observada no osso cortical.

Estudos *in vivo* têm demonstrado que a nitroglicerina (outro doador de NO) apresenta um potencial terapêutico promissor na prevenção de perdas ósseas trabecular e cortical induzidas por ovariectomia ou por corticosteróide (WIMALAWANSA et al., 1996; WIMALAWANSA et al., 1997; WIMALAWANSA, 2000a; WIMALAWANSA, 2000c). Nestes estudos, os parâmetros estudados foram respectivamente: (1) BMD do segmento lombar L2-L4 obtida por DXA antes do sacrifício dos animais, ganho de peso corporal e peso do fêmur; (2) volume ósseo trabecular e cortical da tíbia e do fêmur obtidos através de

histomorfometria, BMD do segmento lombar L2-L4 obtida por DXA antes do sacrifício dos animais, peso do fêmur, medida dos níveis séricos de osteocalcina; (3) BMD do segmento lombar L2-L4 obtida por DXA antes do sacrifício dos animais, ganho de peso corporal e peso do fêmur; (4) Densitometria óssea, níveis séricos de osteocalcina e fosfatase alcalina (marcadores bioquímicos da formação óssea), e níveis urinários de N-telopeptídeos (marcadores bioquímicos da reabsorção óssea). Parece não haver na literatura estudos *in vivo* que investiguem os efeitos de doadores de NO sobre o osso trabecular e cortical utilizando análise metodológica tão minuciosa quanto a adotada em nosso estudo. Assim como parece ser inédito o uso do doador de NO ISDN neste tipo de investigação, e que esta seja realizada em animais orquiectomizados. Porém, o fato desta substância ser usada em tratamentos de patologias cardiovasculares há bastante tempo e ser bem tolerada pelo organismo humano, assim como a nitroglicerina (FUNG, 2004), juntamente com as evidências de que os efeitos antifraturas das substâncias usadas no tratamento da osteoporose masculina são precários (SEEMAN; EISMAN, 2004; HIJAZI; CUNNINGHAM, 2005), correspondem a dados concretos dentro deste contexto. A análise geral dos resultados deste experimento fornece evidências que o ISDN é um agente terapêutico eficaz para a manutenção da integridade esquelética em animais orquiectomizados, tanto quanto a nitroglicerina é para animais ovariectomizados.

4.2 Experimento 2

O tratamento com L-NAME, um inibidor inespecífico das isoformas de NOS, preveniu o efeito da ORX sobre o ganho de peso corporal (PC). Embora o grupo orquiectomizado tratado com salina tenha apresentado uma tendência de aumento de ganho de PC, contradizendo os resultados encontrados na literatura e nos experimentos 1 e 3 deste estudo, os animais ORX tratados com L-NAME apresentaram ganho de peso similar ao do grupo intacto. Esse efeito do tratamento com L-NAME foi observado também por Wimalawansa et al. (1996), onde o ganho de PC de ratas OVX tratadas com L-NAME mostrou-se igual ao de ratas intactas e ao de ratas OVX tratadas com 17β -estradiol, e significativamente menor do que o das ratas OVX não tratadas. Curiosamente, estes dados sugerem que os tratamentos com L-NAME, ISDN e 17β -estradiol promovem efeitos similares sobre o ganho de PC.

A análise dos efeitos do tratamento com L-NAME sobre o osso cortical indica que esta substância minimizou alguns efeitos promovidos pela orquiectomia. Parâmetros como o comprimento do fêmur, BMC e BMD do fêmur total sugerem que o tratamento com L-NAME diminuiu a perda de massa óssea promovida pela castração. As propriedades biomecânicas força no limite elástico, resiliência, força de ruptura e as deformações no ponto de força máxima e no ponto de ruptura indicam que este tratamento aliviou também os efeitos deletérios da castração sobre a integridade óssea e sobre o risco de fratura.

Com relação ao tecido ósseo trabecular, o tratamento com L-NAME parece apresentar um efeito protetor semelhante aquele observado sobre o osso cortical. Este tratamento preveniu os efeitos da castração sobre parâmetros físicos: altura da vértebra, peso seco, peso das cinzas e percentual de material mineral. Além disso, evitou a diminuição da BMD nos terços proximal e distal do fêmur, e do BMC da vértebra L6. Com relação às propriedades biomecânicas, o tratamento com L-NAME apresentou efeito protetor sobre a força no limite elástico. As fotomicrografias parecem reforçar o que foi observado através da análise densitométrica da epífise distal do fêmur.

O fato do L-NAME ser um inibidor inespecífico das isoformas de NOS, enzimas que catalisam a produção de NO a partir do aminoácido L-arginina, e do NO apresentar efeitos preventivos para perdas ósseas decorrentes da deficiência de hormônios sexuais, levantou a hipótese de que o uso do L-NAME intensificaria os efeitos deletérios da castração sobre o tecido ósseo. Contudo, os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com L-NAME, além de não intensificar, minimizou os efeitos deletérios da castração tanto no osso cortical quanto no osso trabecular.

Estudo utilizando ratas Sprague-Dawley mostrou que o tratamento com L-NAME (50 mg/dia) reverteu o efeito protetor do 17β -estradiol sobre a perda de massa óssea induzida por OVX (WIMALAWANSA et al., 1996). Turner et al. (1997), verificaram que ratas de 7 a 8 meses de idade tratadas com L-NAME (29 mg/dia) apresentaram indicativos de aumento da formação óssea e aumento da pressão arterial média (PAM). Estes autores sugeriram que a elevação da PAM estimulou mecanicamente a formação óssea por causar elevação da pressão do líquido intra ósseo.

Neste estudo, utilizou-se uma dose de L-NAME consideravelmente mais baixa do que aquelas administradas nos trabalhos citados acima (25 mg/kg de PC/dia). Portanto, embora a PAM dos animais não tenha sido mensurada, acredita-se que a referida dose não tenha sido suficiente para causar tal efeito.

Por outro lado, trabalhos mais recentes sugerem que o NO sintetizado via eNOS parece ser o mediador para a resposta anabólica do osso ao estrógeno exógeno e para a resposta do osso às cargas mecânicas e ao estresse de cisalhamento (CHAMBERS et al., 1999; ZAMAN et al., 1999; CHOW, 2000; SAMUELS et al., 2001), e que na presença de hormônios sexuais, apenas a isoforma eNOS é expressa pelas células ósseas. Em contraste, o NO produzido via iNOS parece regular os efeitos de citocinas pró-inflamatórias sobre o osso e ser essencial para os efeitos estimulatórios destas sobre a reabsorção óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo* (VAN'T HOF et al., 2000). *In vitro*, o estrógeno bloqueia a síntese de NO via iNOS e estimula o aumento dos níveis de mRNA e da atividade da eNOS. Além disso, estudo sugere que o uso de bloqueadores específicos da isoforma iNOS pode ser um alvo potencial para terapia da osteoporose pós-menopausal (CUZZOCREA et al., 2003).

Baseado nesta exposição, os resultados deste experimento podem indicar que em ratos ORX a síntese de NO via iNOS também pode se encontrar estimulada e que, provavelmente, o efeito protetor promovido pelo inibidor da NOS teria sido mais evidente se fosse usada uma dose mais elevada ou se este fosse específico para a isoforma iNOS.

4.3 Experimento 3

A suplementação com L-arginina, precursor da síntese de NO, parece não ter promovido efeitos significativos sobre a osteopenia induzida pela orquiectomia. A redução do ganho de peso induzida pela orquiectomia foi observada também nos animais ORX tratados com L-arg. Observa-se um aumento significativo dos diâmetros internos maior e menor da diáfise femoral do grupo tratado com L-arg. quando comparado ao grupo intacto. A BMD do fêmur total e dos terços proximal e distal dos animais que receberam L-arg. apresenta uma diminuição significativa em relação aos animais intactos. Estes resultados indicam que o referido tratamento não evitou a perda de massa óssea cortical e trabecular induzida pela orquiectomia. A análise da força no limite elástico e da força máxima obtidas a partir do teste de compressão do corpo vertebral mostra que a competência biomecânica sofreu também os efeitos da castração. Apenas a força de ruptura aplicada ao fêmur durante o teste biomecânico de flexão a três pontos parece apresentar algum efeito positivo da suplementação com L-arg.

Fiore et al. (2000) mostraram que a administração de L-arg. (10 mg/kg de PC/dia) em um período de 28 dias, preveniu a perda óssea induzida por ciclosporina A em

ratas Sprague-Dawley com 10 semanas de idade. Porém, este efeito pode ser atribuído ao fato da ciclosporina A ser uma droga que previne a ligação da NOS a seu substrato por competição. Portanto, o aumento da quantidade de L-arg., provavelmente facilitaria a ligação da enzima a seu substrato.

Uma vez que a literatura mostrou recentemente que a castração promove a indução de produção elevada de NO via iNOS, poderia-se imaginar que esta suplementação pudesse intensificar ainda mais este efeito. Porém, a análise dos resultados apresentados pelos animais suplementados indicam que esta hipótese não é verdadeira, uma vez que os efeitos deletérios da orquiectomia não se encontram acentuados. Portanto, os resultados deste experimento parecem indicar que no microambiente ósseo existe substrato em quantidade suficiente para gerar a elevação da produção de NO, que medeia os efeitos danosos sobre o tecido ósseo, e que a administração exógena de L-arg. não altera este quadro.

Alguns trabalhos indicam que a mineralização óssea recebe interferência da relação cálcio/proteína da dieta e que este fato deve ser levado em consideração em mulheres na pós-menopausa e em homens idosos (DAWSON-HUGHES; HARRIS, 2002). O aumento do consumo de proteínas pode se tornar prejudicial à saúde óssea por estimular perdas excessivas de cálcio ou por acelerar a diminuição da função renal vinculada à idade (MONTILLA; ALDRIGHI; MARUCCI, 2004). Estes dados sugerem que a suplementação com o aminoácido L-arg., sem o acompanhamento de suplementação com cálcio, pode alterar negativamente a homeostasia do tecido ósseo através de efeitos independentes da produção de NO. Contudo, uma suplementação cálcio/L-arg. em proporções adequadas talvez promova efeitos promissores sobre a massa óssea.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através do experimento 1 indicam que o tratamento com o doador de NO ISDN, na dose utilizada neste estudo, é eficaz na prevenção dos efeitos osteopênicos induzidos por orquiectomia, no osso cortical de ratos Wistar. Este tratamento minimizou ainda, os efeitos deletérios da castração no osso trabecular dos mesmos. Portanto, este estudo fornece evidências que o ISDN pode ser usado no futuro como uma alternativa farmacológica de estratégias para a prevenção de osteoporose por deficiência androgênica.

O experimento 2 deste estudo mostrou que o tratamento com L-NAME, além de não intensificar, minimizou os efeitos deletérios da orquiectomia tanto no osso cortical quanto no osso trabecular.

A administração do aminoácido L-arginina não modificou os efeitos resultantes da orquiectomia após um período experimental de oito semanas.

A análise geral dos resultados deste estudo sugere que os efeitos diretos e indiretos do NO sobre o tecido ósseo cortical e trabecular de ratos orquiectomizados mostraram-se mais complexos do que parecia a princípio. Contudo, estes resultados parecem indicar que o NO apresenta um potencial terapêutico promissor no tratamento preventivo da osteoporose induzida por deficiência androgênica, que acomete homens portadores de hipogonadismo ou são submetidos a orquiectomia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BENJAMIN, N. et al. Stomach NO synthesis. **Nature**, v. 368, p. 502, 1994.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, p. 714-718, 1991.

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

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

CHAMBERS, T. J. et al. The role of prostaglandins and nitric oxide in the response of bone to mechanical forces. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, n. 4, p. 422-423, 1999.

CHOW, J. W. M. Role of nitric oxide and prostaglandins in the bone formation response to mechanical loading. **Exercise Sport Sci. Rev.**, v. 28, n. 4, p. 185-188, 2000.

CLARK, J. M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of tibial plateau in dog, rabbit and man. **J. Orthop. Res.**, v. 9, p. 246-257, 1991.

COCKS, T. M. et al. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor from endothelial cells in culture. **J. Cell. Physiol.**, v. 123, p. 310-320, 1985.

CUZZOCREA, S. et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 1098-1107, 2003.

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.**, v. 50, p. 169-174, 1992.

DANZIGER, R. S.; ZUCKERBRAUN, B. S.; PENSLER, J. M. Role of nitric oxide in the regulation of osteoblast metabolism. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 100, n. 3, p. 670-673, 1997.

DARIPA, M.; PAULA, F. J. A.; RUFINO, A. C. B.; FOSS, M. C. Impact of congenital calcitonin deficiency due to dysgenetic hypothyroidism on bone mineral density. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 1, p. 61-68, 2004.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S. S. Calcium intake influences the association of protein intake with rates of bone loss in elderly men and women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 75, p. 773-779, 2002.

EINHORN, T. A. Bone biomechanics. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (Ed.). **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 17-22.

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

ERIKSEN, E. F.; BRIKEN, K.; CHARLES, P. New markers of metabolism: clinical use in metabolic bone disease. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 132, p. 251-263, 1995.

ERSHLER, W. B.; HARMAN, S. M.; KELLER, E. T. Immunologic aspects of osteoporosis. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 21, n. 6, p. 487-499, 1997.

EVANS, D. M.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, n. 3, p. 300-305, 1996.

EVORA, P. R. B. et al. Óxido nítrico e substâncias vasoativas derivadas do endotélio: papel no controle do tônus vascular. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 6, n. 2, p. 129-137, 1996.

FEELISCH, M. Biotransformation to nitric oxide of organic nitrates in comparison to other nitrovasodilators. **Eur. Heart J.**, v. 14, suppl. 1, p. 123-132, 1993.

FIGLIORE, C. E. et al. L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporin A-treated rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 408, n. 3, p. 323-326, 2000.

FOX, S. W.; CHOW, J. W. Nitric oxide synthase expression in bone cells. **Bone**, v. 23, p. 1-6, 1998.

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

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 165-194, 1995.

FUNG, H. L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 67-85, 2004.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-Derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, p. 385-388, 1988.

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Skeletal tissue response to cytokines. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 258, p. 245-278, 1990.

GUNNESS, M.; ORWOLL, E. Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, n. 11, p. 1735-1744, 1995.

HELFRICH, M. H.; EVANS, D. E.; GRABOWSKI, P. S.; POLLOCK, J. S.; OHSHIMA, H.; RALSTON, S. H. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, p. 1108-1115, 1997.

HIJAZI, R. A.; CUNNINGHAM, G. R. Andropause: is androgen replacement therapy indicated for the aging male? **Annu. Rev. Med.**, v. 56, p. 117-137, 2005.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Pharmacol. Toxicol.**, v.39, p. 191-200, 1999.

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

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

JOHNSTON JR., C. C.; SLEMENDA, C. W. Pathogenesis of the osteoporosis. **Bone**, v. 17, p. 19-22, 1995.

JOHNSTON JR., C. C. Development of clinical practice guidelines for prevention and treatment of osteoporosis. **Calcif. Tissue Int.**, [suppl. 1], v. 59, p. 30-33, 1996.

JUNQUEIRA, P. A. A.; FONSECA, A. M.; ALDRIGHI, J. M. Osteoporose: diretrizes futuras. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 47, n. 1, p. 14-15, 2001.

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

KANIS, J. A. et al. The diagnosis of osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, n. 8, p. 1137-1141, 1994.

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

KHOSLA, S.; MELTON, L. J. 3rd; ATKINSON, E. J. et al. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 2266-2274, 1998.

KIEBZAK, G. M. et al. Bone status of senescent male rats: chemical, morphometric, and mechanical analysis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 3, n. 1, p. 37-45, 1988.

KITA, Y. et al. Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmacological actions of FK 409. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 257, n. 1-2, p. 123-130, 1994.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase in mammals. **Biochem. J.**, v. 298, p. 249-258, 1994.

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

LIN, H. C. et al. Effect of long-term octreotide and isosorbide dinitrate on haemodynamics in rats with portal vein stenosis. **Clin. Sci. Colch.**, v. 94, n. 6, p. 645-650, 1998.

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

LOWENSTEIN, C. J.; GLATT, C. S.; BREDET, D. S.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 6711-6715, 1992.

MANCINI, L. et al. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are GMPc dependent. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 274, p. 477-481, 2000.

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

MARLETTA, M. A. et al. Macrophage oxidation of L-Arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p. 8706-8711, 1988.

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

MASCOLO, N. et al. Inhibitors of nitric oxide synthetase prevent castor-oil-induced diarrhoea in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, n. 4, p. 861-864, 1993.

MELTON III, L. J. et al. Osteoporosis and the risk of hip fracture. **Am. J. Epidemiol.**, v. 124, p. 254-261, 1986.

MICHELL, B. J. et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. **Current. Biol.**, v. 9, p. 845-848, 1999.

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

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine - nitric oxide pathway. **New Engl. J. Med.**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTEAGUDO, M. D. et al. Comparison of the bone robusticity index and bone weight/bone length index with the results of bone densitometry and bone histomorphometry in experimental studies. **Acta Anat.**, v. 160, p. 195-199, 1997.

MONTILLA, R. N. G.; ALDRIGHI, J. M.; MARUCCI, M. F. N. Relação cálcio/proteína da dieta de mulheres no climatério. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 50, n. 1, p. 52-54, 2004.

MOODY, J. A. et al. Effects of long-term oral administration of L-arginine on the rat erectile response. **J. Urol.**, v. 158, n. 3, p. 942-947, 1997.

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

MUNDY, G. R. et al. Cytokines and bone remodeling. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (Ed.). **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 301-313.

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

ORWOLL, E. S. et al. Androgen receptors in osteoblast – like cell lines. **Calcif. Tissue Int.**, v. 49, p. 182-187, 1991.

O'SHAUGHNESSY, M. C. et al. Nitric oxide mediates 17 β -estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 277, n. 3, p. 604-610, 2000.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium - derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

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

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

PENG, Z. et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PINTO NETO, A. M. et al. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 42, n. 6, p. 343-354, 2002.

PRICKAERTS, J. et al. Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal N-Nitro-L-Arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats. **Neuroscience**, v. 87, n. 1, p. 181-195, 1998.

RALSTON, S. H. et al. Nitric oxide: a cytokine – induced regulator of bone resorption. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, n. 7, p. 1040-1049, 1995.

RALSTON, S. H.; GRABOWSKI, P. S. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. **Bone**, v. 19, n. 1, p. 29-33, 1996.

RAMALHO, A. C. et al. Osteoporotic fractures of proximal femur: clinical and epidemiological features in a population of the city of São Paulo. **São Paulo Med. J./Rev. Paul. Med.**, v. 119, n. 2, p. 48-53, 2001.

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

RIZZOLI, R.; BONJOUR, J-P.; FERRARI, S. L. Osteoporosis, genetics and hormones. **J. Molecular Endocrinol.**, v. 26, p. 79-94, 2001.

ROBINSON, L. J.; WEREMOWICZ, Z.; MORTON, C. C.; MICHEL, T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (nos 3) gene. **Genomics**, v. 19, p. 350-357, 1994.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 455-498, 2006.

SAMUELS, A. et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. **Bone**, v. 29, n. 1, p. 24-29, 2001.

SCHÖNAU, E. The peak bone mass concept: is it still relevant? **Pediatric Nephrology**, v. 19, n. 8, p. 825-831, 2004.

SEDLIN, E. D.; HIRSCH, C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. **Acta Orthop. Scand.**, v. 37, p. 29-47, 1966.

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

SIKIRI, P. et al. The influence of a novel pentadecapeptide BPC 157, on N(G) - Nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 332, n. 1, p. 23-33, 1997.

SØGAARD, C. H. et al. A comparison of the effects of two anabolic agents (Fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, p. 439-449, 1997.

SØGAARD, C. H. et al. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. **Bone**, v. 16, n. 1, p. 163-169, 1995.

SØGAARD, C. H. et al. Long-term exercise of young and adult female rats: effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, n. 3, p. 409-416, 1994.

SOMJEN, D. et al. Modulation by vitamin D status of the responsiveness of rat bone to gonadal steroids. **Endocrinology**, v. 125, p. 1870-1876, 1989.

THOMPSON, D. D. et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4, suppl., p. 125-133, 1995.

TURNER, C. H. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. **Bone**, v. 21, n. 5, p. 487-490, 1997.

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

VANDERSCHUEREN, D.; BOUILLON, R. Androgens and bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 56, p. 341-346, 1995.

VAN'T HOF, R. J. et al. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5068-5074, 2004.

VAN'T HOF, R. J. et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1 – induced osteoclastic bone resorption. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 14, p. 7993-7998, 2000.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology**, v. 103, p. 255-261, 2001.

VISSER, J. J.; HOEKMAN, K. Arginine supplementation in the prevention and treatment of osteoporosis. **Med. Hypotheses**, v. 43, n. 5, p. 339-342, 1994.

WALLACH, S. Cytokines and bone metabolism. **Calcif. Tissue Int.**, v. 53, p. 293-296, 1993.

WANG, F-S. et al. Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2148-2156, 2004.

WIMALAWANSA, S. J. et al. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. **Bone**, v. 18, n. 4, p. 301-304, 1996.

WIMALAWANSA, S. J. et al. Prevention of corticosteroid – induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. **Bone**, v. 21, p. 275-280, 1997.

WIMALAWANSA, S. J. Nitroglycerin therapy is as efficacious as standard estrogen replacement therapy (Premarin) in prevention of oophorectomy-induced bone loss: a human pilot clinical study. **J. Bone Miner. Res.**, v. 15, n. 11, p. 2240-2244, 2000a.

WIMALAWANSA, S. J. Prevention and treatment of osteoporosis: efficacy of combination of hormone replacement therapy with other antiresorptive agents. **J. Clinic. Densitomet.**, v. 4, n. 2, p. 187-201, 2000b.

WIMALAWANSA, S. J. Restoration of ovariectomy-induced osteopenia by nitroglycerin. **Calcif. Tissue Int.**, v. 66, n. 1, p. 56-60, 2000c.

WIMALAWANSA, S. J. Therapeutic options in prevention and treatment of osteoporosis. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v. 12, p. 1-27, 1993.

ZAJICKOVA, K.; ŽOFKOVA, I. Osteoporosis: genetic analysis of multifactorial disease. **Endocrine Regulations**, v. 37, p. 31-44, 2003.

ZAMAN, G. et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, n. 7, p. 1123-1131, 1999.

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

ZHOU, H.; CHERNECKY, R.; DAVIES, J. E. Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, n. 3, p. 367-374, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Probabilidade do teste estatístico do Experimento 1.

Tabela A: Parâmetros biométricos de ratos dos grupos referentes ao experimento 1.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 1 vs BASAL 1	ORX 1 vs BASAL 1	ORX + ISDN vs BASAL 1	ORX 1 vs INTA 1	ORX + ISDN vs INTA 1	ORX + ISDN vs ORX 1
PC inicial (g)	0,7544	0,8371	0,7577	0,2991	0,9671	0,8048
PC final (g)	-	-	-	0,9018	0,7108	0,7104
Ganho de PC (g)	-	-	-	0,0052	0,7732	0,0973

Tabela B: Parâmetros biométricos, biomecânicos e densitométricos dos fêmures de ratos dos grupos referentes ao experimento 1.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 1 vs BASAL 1	ORX 1 vs BASAL 1	ORX + ISDN vs BASAL 1	ORX 1 vs INTA 1	ORX + ISDN vs INTA 1	ORX + ISDN vs ORX 1
L (mm)	0,0043	0,0033	0,0418	0,8369	0,5358	0,9015
Diâm. Externo > (mm)	0,0018	0,0007	0,0002	0,2268	0,1673	>0,9999
Diâm. Externo < (mm)	0,0056	0,0115	0,0907	0,5918	0,7108	0,4557
Diâm. Interno > (mm)	0,0693	0,0003	0,0229	0,0008	0,0831	0,3176
Diâm. Interno < (mm)	0,0073	0,0002	0,0164	0,0130	0,8369	0,0728
Espes. Parede lat. (mm)	0,0409	0,3510	0,3510	0,9018	0,6504	0,9015
Espes. Parede méd. (mm)	0,0227	0,5360	0,0549	0,0130	0,4824	0,0175
Espes. Parede ant. (mm)	0,5538	0,1738	>0,9999	0,0556	0,6504	0,2086
Espes. Parede post. (mm)	0,7544	0,0052	0,0229	0,0098	0,0449	0,3176
Mom. de inércia (mm ⁴)	0,0007	0,0021	0,0003	0,7732	0,6504	>0,9999
Força limite elástico (N)	0,0024	0,7577	0,0907	0,0283	0,3845	0,2086
Deform.limit.elást. (mm)	0,9723	0,0115	0,7577	0,0283	0,9018	0,0111
Rigidez (N/mm)	0,0033	0,2523	0,0712	0,0683	0,1198	0,3829
Resiliência (mJ)	0,0955	0,2105	0,1416	0,0283	0,6504	0,0973
Força máxima (N)	<0,0001	0,0129	0,0002	0,0171	0,2991	0,0728
Deform.Forç.máx. (mm)	0,2188	0,5060	0,5360	0,5918	0,2614	0,4757
Capac.absor.energia (mJ)	0,0007	0,0021	0,0311	0,8369	0,1003	0,2086
Força de ruptura (N)	<0,0001	0,8371	0,0229	0,0012	0,0831	0,0379
Deform. Ruptura (mm)	0,2188	0,1416	0,9182	0,0449	0,5918	0,2593
Tenacidade (mJ)	0,0227	0,0007	0,0115	0,1158	0,9671	0,2593

Momento máx. (N.mm)	<0,0001	0,0229	0,0002	0,0171	0,2991	0,0728
BMC (g) FE total	0,0001	0,0079	0,0012	0,0683	0,2991	0,5350
BA (cm ²) FE total	0,0339	0,0052	0,1142	0,3845	0,8369	0,2086
BMD (g/cm ²) FE total	<0,0001	0,0549	0,0007	0,0002	0,1673	0,0175
BMC (g) 1/3 distal FE	0,0002	0,0712	0,0007	0,0556	0,6504	0,0262
BA (cm ²) 1/3 distal FE	0,3451	0,2105	0,6065	0,5918	0,7732	0,3829
BMD(g/cm ²) 1/3 distal FE	<0,0001	0,2105	0,0002	0,0003	0,8369	0,0023
BMC (g) 1/3 médio FE	<0,0001	0,0007	0,0007	0,2991	0,7732	0,3829
BA (cm ²) 1/3 médio FE	0,0005	0,0002	0,0033	0,0358	0,9671	0,2086
BMD(g/cm ²)1/3 médio FE	<0,0001	0,0418	0,0021	0,0018	0,5358	0,0262
BMC (g) 1/3 prox. FE	0,0007	0,0115	0,0418	0,0683	0,2991	0,9015
BA (cm ²) 1/3 prox. FE	0,0585	0,0079	0,1738	0,3845	0,8369	0,3173
BMD(g/cm ²) 1/3 prox. FE	<0,0001	0,0712	0,0033	0,0003	0,0052	0,2086

Tabela C: Parâmetros densitométricos da vértebra L6 e parâmetros físicos e biomecânicos do corpo da vértebra L5 de ratos dos grupos referentes ao experimento 1.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 1 vs BASAL 1	ORX 1 vs BASAL 1	ORX + ISDN vs BASAL 1	ORX 1 vs INTA 1	ORX + ISDN vs INTA 1	ORX + ISDN vs ORX 1
BMC (g) VL6	<0,0001	0,0311	0,0164	0,0098	0,0556	0,9015
BA (cm ²) VL6	0,0003	0,0079	0,0164	0,1956	0,2268	0,8048
BMD (g/cm ²) VL6	<0,0001	0,1416	0,0311	0,0026	0,0037	0,9015
Altura (mm)	0,0056	0,0012	0,0079	0,0831	0,9018	0,0728
Peso do osso imerso (g)	<0,0001	0,0021	0,0007	0,1422	0,1003	0,4557
Peso do osso úmido (g)	0,0148	0,0002	0,0052	<0,0001	0,1422	0,0262
Peso do osso seco (g)	0,0003	0,0052	0,0033	0,5358	0,2991	>0,9999
Peso das cinzas (g)	<0,0001	0,0007	0,0007	0,4824	0,3845	>0,9999
Volume Ósseo (cm ³)	0,0585	0,0002	0,0079	<0,0001	0,0221	0,0041
Dens. Óssea (g/cm ³)	<0,0001	0,0164	0,4698	<0,0001	<0,0001	0,0111
Dens. Óssea/100g de PC	0,5538	0,0007	0,0907	0,0171	0,1673	0,8048
Dens. Mineral (g/cm ³)	<0,0001	0,0712	0,2523	<0,0001	<0,0001	0,0262
Dens. Min./100g de PC	0,0491	0,0021	0,2523	<0,0001	0,0037	0,0175
% Ósseo de Água	0,0033	0,0033	0,2523	<0,0001	<0,0001	0,0175
% Material Orgânico	0,4639	0,0002	0,0002	<0,0001	0,0005	0,0111
% Material Mineral	<0,0001	0,1416	0,2105	<0,0001	<0,0001	0,0379

Área de Sec. Trans.(mm ²)	0,9723	0,0002	0,0079	<0,0001	0,0026	0,0379
Força limite elástico (N)	<0,0001	>0,9999	0,2105	0,0026	0,0026	0,4557
Deform. limite elást. (mm)	0,1111	0,2105	0,4698	0,9671	0,1956	0,5350
Rigidez (N/mm)	0,5538	0,0418	0,4079	0,0012	0,4824	0,0728
Capac. absorv. energ. (mJ)	0,0024	0,3510	0,2523	0,1422	0,0008	>0,9999
Força Máxima (N)	0,0955	0,0907	0,2523	0,0026	0,0026	0,4557
Deformação Máx. (mm)	0,0815	0,0549	0,0164	0,7108	0,4320	0,3176
Tenacidade (Mpa)	0,0073	0,2523	0,6806	0,0130	0,0098	0,3829

APÊNDICE B – Probabilidade do teste estatístico do Experimento 2

Tabela D: Parâmetros biométricos de ratos dos grupos referentes ao experimento 2.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 2 vs BASAL 1	ORX 2 vs BASAL 1	ORX+L- NAME vs BASAL 1	ORX 2 vs INTA 2	ORX+L- NAME vs INTA 2	ORX+L- NAME vs ORX 2
PC inicial (g)	0,7802	0,3704	0,2105	0,3599	0,4747	0,9551
PC final (g)	-	-	-	0,3154	0,3638	0,9551
Ganho de PC (g)	-	-	-	0,2743	0,8125	0,4634

Tabela E: Parâmetros biométricos, biomecânicos e densitométricos dos fêmures de ratos dos grupos referentes ao experimento 2.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 2 vs BASAL 1	ORX 2 vs BASAL 1	ORX+L- NAME vs BASAL 1	ORX 2 vs INTA 2	ORX+L- NAME vs INTA 2	ORX+L- NAME vs ORX 2
L (mm)	0,0006	0,0745	0,1738	0,0155	0,1613	0,8665
Diâm. Externo > (mm)	0,0220	0,0206	0,2991	>0,9999	0,7396	0,6943
Diâm. Externo < (mm)	0,0172	0,4234	>0,9999	0,0676	0,0097	0,2319
Diâm. Interno > (mm)	0,3562	0,4807	0,2991	0,1457	0,8868	0,1520
Diâm. Interno < (mm)	0,0653	0,2359	0,2991	0,5726	0,3638	0,6943
Espes. Parede lat. (mm)	0,4470	0,0037	0,4079	0,0085	0,8125	0,0401
Espes. Parede méd. (mm)	0,1128	0,6058	>0,9999	0,3154	0,1932	0,6943
Espes. Parede ant. (mm)	0,2110	0,5414	0,8371	0,5148	0,3148	0,6943
Espes. Parede post. (mm)	0,7197	0,1388	0,0229	0,0831	0,0136	0,2319
Mom. de inércia (mm ⁴)	0,0172	0,0360	0,3510	0,6965	0,4173	0,4634
Força limite elástico (N)	<0,0001	0,0745	0,0052	0,0155	0,1331	0,3969
Deform.limit.elást. (mm)	0,5490	0,7430	>0,9999	0,4082	0,4747	0,7789
Rigidez (N/mm)	<0,0001	0,0592	0,0907	0,0014	0,0431	0,3357
Resiliência (mJ)	0,0133	0,5414	0,0418	0,1457	0,4747	0,4634
Força máxima (N)	<0,0001	0,0010	0,0007	0,0044	0,0136	0,3969
Deform.Forç.máx. (mm)	0,0535	0,6730	0,5360	0,1011	0,0431	0,4634
Capac.absor.energia (mJ)	0,0004	0,0745	0,4079	0,0434	0,0136	0,6126
Força de ruptura (N)	0,0060	0,0927	0,0052	0,0205	0,1932	0,1206
Deform. Ruptura (mm)	0,5490	0,6058	0,1142	0,8968	0,0068	0,9390
Tenacidade (mJ)	0,0021	0,1388	0,2523	0,2031	0,0136	0,2810

Momento máx. (N.mm)	<0,001	0,0010	0,0007	0,0044	0,0136	0,3969
BMC (g) FE total	0,0006	0,0592	0,0418	0,0044	0,1331	0,2319
BA (cm ²) FE total	0,0172	0,9626	0,6806	0,0031	0,1932	0,4634
BMD (g/cm ²) FE total	0,0002	0,0025	0,0031	0,0031	0,0878	0,0939
BMC (g) 1/3 distal FE	<0,0001	0,4234	0,0907	0,0002	0,0097	0,3357
BA (cm ²) 1/3 distal FE	0,0279	0,0745	0,4698	0,0009	0,0185	0,3969
BMD(g/cm ²) 1/3 distal FE	<0,0001	0,0006	0,0003	0,0014	0,0068	0,1893
BMC (g) 1/3 médio FE	0,0030	0,0360	0,0229	0,1457	0,2698	0,6973
BA (cm ²) 1/3 médio FE	0,0172	0,2359	0,1738	0,4082	0,4747	0,7789
BMD(g/cm ²)1/3 médio FE	0,0015	0,0111	0,0079	0,1220	0,1932	0,6943
BMC (g) 1/3 prox. FE	0,0010	0,2766	0,0229	0,0085	0,3638	0,1893
BA (cm ²) 1/3 prox. FE	0,0947	0,8884	0,4698	0,0676	0,8125	0,3357
BMD(g/cm ²) 1/3 prox. FE	0,0006	0,0592	0,0052	0,0085	0,3638	0,1206

Tabela F: Parâmetros densitométricos da vértebra L6 e parâmetros físicos e biomecânicos do corpo da vértebra L5 de ratos dos grupos referentes ao experimento 2.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 2 vs BASAL 1	ORX 2 vs BASAL 1	ORX+L- NAME vs BASAL 1	ORX 2 vs INTA 2	ORX+L- NAME vs INTA 2	ORX+L- NAME vs ORX 2
BMC (g) VL6	<0,0001	0,0079	0,0115	0,0266	0,0878	0,6943
BA (cm ²) VL6	<0,0001	0,0037	0,0115	0,0545	0,3638	0,7789
BMD (g/cm ²) VL6	0,0010	0,0464	0,0418	0,1011	0,0553	0,7789
Altura (mm)	0,0350	0,0745	0,0115	0,8968	0,0878	0,1893
Peso do osso imerso (g)	0,0003	0,0360	0,0164	0,0676	0,2295	0,6943
Peso do osso úmido (g)	0,0279	0,7430	0,2523	0,0343	0,2698	0,3969
Peso do osso seco (g)	0,0010	0,3213	0,0418	0,0005	0,0878	0,1893
Peso das cinzas (g)	0,0002	0,1388	0,0229	0,0021	0,1088	0,2319
Volume Ósseo (cm ³)	0,0947	0,7430	0,4079	0,0676	0,3148	0,4634
Dens. Óssea (g/cm ³)	0,0003	0,0055	0,0021	0,7618	0,3148	0,7789
Dens. Óssea/100g de PC	0,1564	0,6730	0,8371	0,5148	0,5362	0,7789
Dens. Mineral (g/cm ³)	<0,0001	0,0206	0,0012	0,1457	0,0553	0,7789
Dens. Min./100g de PC	0,1128	0,3704	0,3510	0,6334	0,5362	>0,9999
% Ósseo de Água	<0,0001	0,5414	0,0164	0,0014	0,0250	0,1893
% Material Orgânico	0,0435	0,1388	0,4698	<0,0001	0,0185	0,3357
% Material Mineral	<0,0001	0,0464	0,0012	0,0044	0,0553	0,5358

Área de Sec. Trans.(mm ²)	0,3562	0,1672	0,5360	0,0085	0,0136	>0,9999
Força limite elástico (N)	0,0021	0,7430	0,0496	0,0031	0,0727	0,0593
Deform. limite elást. (mm)	0,6028	0,8824	0,1135	0,9654	0,0559	0,1812
Rigidez (N/mm)	0,9682	0,7430	0,3884	0,4082	0,0420	0,6620
Capac. absorv. energ. (mJ)	0,0220	0,7430	0,0360	0,0676	0,4278	0,0293
Força Máxima (N)	0,1823	0,4234	0,3884	0,0831	0,0030	>0,9999
Deformação Máx. (mm)	0,0535	0,0927	0,0120	>0,9999	0,3132	0,2284
Tenacidade (Mpa)	0,0350	0,8148	0,8639	0,0266	0,0727	0,9497

APÊNDICE C – Probabilidade do teste estatístico do Experimento 3.

Tabela G: Parâmetros biométricos de ratos dos grupos referentes ao experimento 3.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 3 vs BASAL 3	ORX 3 vs BASAL 3	ORX + L-ARG vs BASAL 3	ORX 3 vs INTA 3	ORX + L-ARG vs INTA 3	ORX + L-ARG vs ORX 3
PC inicial (g)	0,1520	>0,9999	0,1649	0,3969	0,6943	0,6200
PC final (g)	-	-	-	0,0401	0,0289	0,5350
Ganho de PC (g)	-	-	-	0,0003	0,0002	0,8665

Tabela H: Parâmetros biométricos, biomecânicos e densitométricos dos fêmures esquerdos de ratos dos grupos referentes ao experimento 3.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 3 vs BASAL 3	ORX 3 vs BASAL 3	ORX + L-ARG vs BASAL 3	ORX 3 vs INTA 3	ORX + L-ARG vs INTA 3	ORX + L-ARG vs ORX 3
L (mm)	0,0003	0,0012	0,0037	0,1520	0,0650	0,6943
Diâm. Externo > (mm)	0,0003	0,0070	0,0003	0,6126	0,0379	0,0939
Diâm. Externo < (mm)	0,8665	0,2086	0,0939	0,2319	0,1304	0,8665
Diâm. Interno > (mm)	0,1893	0,0070	0,0003	0,0939	0,0070	0,2810
Diâm. Interno < (mm)	0,6943	0,0379	0,0140	0,0939	0,0379	0,9551
Espes. Parede lat. (mm)	0,0205	0,1649	0,0093	0,6126	0,9591	0,6126
Espes. Parede méd. (mm)	0,1893	0,7104	0,3357	0,3357	0,5737	0,6126
Espes. Parede ant. (mm)	>0,9999	0,3829	0,6126	0,4634	0,6454	0,1520
Espes. Parede post. (mm)	0,2810	0,0728	0,0205	0,4634	0,2345	0,6943
Mom. de inércia (mm ⁴)	0,0022	0,0070	0,0006	0,6943	0,0650	0,1206
Força limite elástico (N)	0,0022	0,0262	0,0530	0,1206	0,0939	>0,9999
Deform.limit.elást. (mm)	0,2810	0,9015	0,8048	0,2810	0,7789	0,8048
Rigidez (N/mm)	0,0140	0,0728	0,0728	0,1520	0,3357	0,9015
Resiliência (mJ)	0,0093	0,2086	0,1282	0,1206	0,3357	0,5350
Força máxima (N)	0,0003	0,0111	0,0006	0,2319	0,6943	>0,9999
Deform.Forç.máx. (mm)	0,1520	0,8048	0,2593	0,1520	0,7789	0,3176
Capac.absor.energia (mJ)	0,0093	0,6200	0,0530	0,0939	0,7789	0,2086
Força de ruptura (N)	0,0006	0,0973	0,0023	0,0205	0,3357	0,1282
Deform. Ruptura (mm)	0,9551	0,4557	0,9015	0,4634	0,7789	0,4557
Tenacidade (mJ)	0,0721	0,6200	0,0973	0,4634	0,9551	0,3829

Momento máx. (N.mm)	0,0003	0,0111	0,0006	02319	0,6943	>0,9999
BMC (g) FE total	0,0003	0,0530	0,0037	0,2810	0,1949	0,6943
BA (cm ²) FE total	0,0037	0,1649	0,0093	0,3969	0,8785	0,5358
BMD (g/cm ²) FE total	0,0003	0,0111	0,0022	0,0721	0,0148	>0,9999
BMC (g) 1/3 distal FE	0,0003	0,0175	0,0006	0,3357	0,1304	0,6943
BA (cm ²) 1/3 distal FE	0,0022	0,2593	0,0289	0,6126	0,7209	0,6126
BMD(g/cm ²) 1/3 distal FE	0,0003	0,0070	0,0006	0,1893	0,0207	0,9551
BMC (g) 1/3 médio FE	0,0006	0,0530	0,0093	0,2810	0,3262	0,8665
BA (cm ²) 1/3 médio FE	0,0012	0,0728	0,0037	0,5358	0,8785	0,7789
BMD(g/cm ²)1/3 médio FE	0,0006	0,0262	0,0093	0,2319	0,0650	0,6126
BMC (g) 1/3 prox. FE	0,0003	0,0728	0,0059	0,0721	0,1304	0,3969
BA (cm ²) 1/3 prox. FE	0,0093	0,0973	0,0140	0,1893	0,9591	0,6126
BMD(g/cm ²) 1/3 prox. FE	0,0003	0,0530	0,0037	0,0205	0,0104	0,8665

Tabela I: Parâmetros densitométricos da vértebra L6 e parâmetros físicos e biomecânicos do corpo da vértebra L5 de ratos dos grupos referentes ao experimento 3.

Parâmetros	Comparações					
	INTA 3 vs BASAL 3	ORX 3 vs BASAL 3	ORX + L-ARG vs BASAL 3	ORX 3 vs INTA 3	ORX + L-ARG vs INTA 3	ORX + L-ARG vs ORX 3
BMC (g) VL6	0,0012	0,2593	0,0205	0,0721	0,4418	0,4634
BA (cm ²) VL6	0,0006	0,0728	0,0059	0,2319	0,5737	0,6126
BMD (g/cm ²) VL6	0,0022	0,4557	0,1520	0,0939	0,1605	0,3969
Altura (mm)	0,0070	0,5350	0,0401	0,0262	0,0401	0,4634
Peso do osso imerso (g)	0,0006	0,1649	0,0037	0,0530	0,1206	0,3969
Peso do osso úmido (g)	0,0175	0,8048	0,0541	0,1282	0,1520	0,4634
Peso do osso seco (g)	0,0006	0,3176	0,0093	0,0530	0,1206	0,3969
Peso das cinzas (g)	0,0006	0,2593	0,0037	0,0530	0,0939	0,3969
Volume Ósseo (cm ³)	0,0530	0,9015	0,2319	0,2086	0,1520	0,6126
Dens. Óssea (g/cm ³)	0,0006	0,0175	0,0059	0,0530	0,2810	0,2319
Dens. Óssea/100g de PC	0,0006	0,9015	0,0289	0,1649	0,0541	0,5358
Dens. Mineral (g/cm ³)	0,0012	0,0530	0,0059	0,0379	0,2319	0,2319
Dens. Min./100g de PC	>0,9999	0,8048	0,7789	0,8048	0,6943	0,8665
% Ósseo de Água	0,0070	0,0973	0,0289	0,0973	0,1893	0,4634
% Material Orgânico	0,3176	0,2086	0,6126	>0,9999	0,7789	0,6943
% Material Mineral	0,0041	0,3176	0,0140	0,0262	0,2319	0,1893

Área de Sec. Trans.(mm ²)	0,5350	0,9015	0,7789	0,9015	0,8665	0,9551
Força limite elástico (N)	0,0006	0,0530	0,0003	0,0175	0,0037	0,9551
Deform. limite elást. (mm)	0,9015	0,2593	0,9551	0,1282	0,5358	0,0037
Rigidez (N/mm)	0,8048	0,3176	0,8665	0,6200	0,3969	0,1893
Capac. absorv. energ. (mJ)	0,1282	0,8048	0,1206	0,0262	0,4634	0,0059
Força Máxima (N)	0,1282	0,9015	0,9551	0,0262	0,0140	0,8665
Deformação Máx. (mm)	0,0111	0,0728	0,1206	0,7104	0,2810	0,1206
Tenacidade (Mpa)	0,2593	>0,9999	0,2810	0,1649	0,6943	0,2810
