

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITOS DO CHUMBO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO
TECIDO ÓSSEO DE RATAS**

VALÉRIA GONÇALVES ALBIERI MATTOS

SÃO CARLOS
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITOS DO CHUMBO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO
TECIDO ÓSSEO DE RATAS**

VALÉRIA GONÇALVES ALBIERI MATTOS

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 Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS
2010

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

M444ec

Mattos, Valéria Gonçalves Albieri.

Efeitos do chumbo sobre o desenvolvimento do tecido ósseo de ratas / Valéria Gonçalves Albieri Mattos. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

122 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

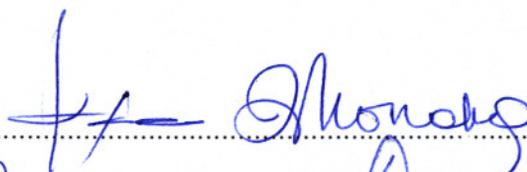
1. Medicina experimental - rata. 2. Tecido ósseo. 3. Chumbo. 4. Biomecânica óssea. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Valéria Gonçalves Albieri Mattos

Prof^a. Dr^a. Keico Okino Nonaka.....



Prof^a. Dr^a. Patricia Driusso.....



Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro.....



Prof. Dr. Derval Bertoncello.....



Prof^a. Dr^a. Cecilia Helena de Azevedo Gouveia.....



Orientadora
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Ao meu esposo, Maurício, por ser meu alicerce emocional nesta trajetória.

As minhas filhas, Camila e Bruna, por serem a minha fonte de vida e inspiração.

Aos meus pais, Albieri e Cydha, por acreditarem em mim e pela segurança recebida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por conduzir meus passos todos os dias, através da minha fé, onde encontrei forças sobrenaturais para seguir em frente e concluir este trabalho com muito carinho.

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

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, por ter me dado oportunidade de participar deste programa de Pós-Graduação, e de conviver com sua competência e ética profissional no decorrer deste tempo;

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, especialmente Sr. Sérgio Dias;

Aos professores Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte / Departamento de Educação Física e Motricidade Humana – UFSCar, Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes / Laboratório de Histologia e Microscopia / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar e Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto / Departamento de Fisioterapia – UFSCar pelas contribuições importantes no exame de qualificação;

Aos (ex e atuais) pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia Charles Chenwei Wang, Daniel Mochiutti, Edvanina de Souza Costa Queiroz, Fábio Alexandre Casarin

Pastor, Fernando Vidal D'Ávila, José Aparecido Ferreira, Juciléia Barbosa Bezerra, Leandro Dias Gonçalves Ruffoni, pelo companheirismo indispensável ao cumprimento deste trabalho;

À minha irmã, Valesca Gonçalves Albieri e meu cunhado, Alexandre Mello Barbosa, por acreditarem em mim e apoiarem minha iniciativa, com muito carinho;

Aos meus sogros, José Roberto Gomes de Mattos e Maria Angélica Loreti Mattos, pelo grande apoio sempre que precisei, sem medirem esforços.

Aos meus cunhados Antônio Walter Frujuelli filho e Valéria Loreti Gomes de Mattos Frujuelli, pelo grande apoio.

À Gabriela Schiffler, Janaína Baeta, Tatiana Ribeiro, amigas e colegas Dentistas, pelo apoio durante o tempo que estive afastada do consultório em prol do Doutorado;

Aos meus sobrinhos Arthur Gonçalves Barbosa, Luisa Loretti Mattos Frujuelli e Renzo Loretti Mattos Frujuelli pelo grande amor recebido através de seus olhares, incentivando minha inspiração.

“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, então, não é um ato, mas um hábito”.

(Aristóteles)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do chumbo sobre fêmures e vértebras de ratas durante seu desenvolvimento e maturidade esquelética. Para este propósito, ratas com um mês de idade foram intoxicadas com acetato de chumbo 100mg/Kg de massa corporal, e os grupos controles tratados com salina 0,9% 0,1 ml/100g de massa corporal. O tratamento foi realizado via gavagem gástrica, uma vez por semana, durante 2 meses. Após este período, a contaminação foi cessada e os animais receberam apenas água e ração comercial *ad libitum* até completarem 6, 9 e 12 meses de vida, sendo os animais do grupo 3 meses eutanasiados ao final do tratamento. A incorporação do chumbo no tecido ósseo ocorreu em todos os grupos de animais intoxicados. O chumbo não prejudicou o desenvolvimento corporal dos animais experimentais. No teste de flexão a três pontos, foi observada a redução da força máxima, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais contaminados dos grupos 6, 9 e 12 meses. Nas vértebras (teste de compressão), esta redução foi evidente em ratas maduras esqueléticamente (9 meses de idade). O presente estudo revelou que a exposição ao chumbo, durante o estágio inicial de desenvolvimento esquelético, afeta o perfil mineral ósseo levando ao enfraquecimento biomecânico com a maturidade esquelética. Os resultados nos levam a concluir que a exposição ao chumbo afeta as propriedades biomecânicas do osso maduro aumentando a predisposição à fraturas.

Palavras chave: tecido ósseo, propriedades biomecânicas, chumbo, rato.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of lead on femurs and vertebrae during development and skeletal maturity of female rats. For this purpose, one month old female rats were treated with lead acetate 100mg/kg BW or saline 0,9% 0,1ml/100g BW . The treatment was administrated by gastric gavage, once a week, during two months. After the treatment period, the animals received only tap water and commercial chow *ad libitum* until they completed 6, 9 and 12 months of life. The 3 months old groups were sacrificed soon after the treatment. The incorporation of lead in bone tissue occurred in all groups of intoxicated animals. The lead did not interfere the body development of experimental animals. The lead intoxication induced reduced maximum load, stiffness and resilience of the femur in the three-point bending test in the groups 6, 9 and 12 months of life. The compression test of vertebrae of contaminated rats showed reduction of biomechanical parameters only in skeletally mature rats (9 months). The present study revealed that lead exposure during early stage of development affected the bone mineral profile leading to biomechanical weakness with skeletal maturity. The results allow us to conclude that lead exposure affects the biomechanical properties of mature bone increasing susceptibility to fractures.

Key words: bone tissue, biomechanical properties, lead, rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Protocolo Experimental.....	29
Figura 2.	Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron 4444.....	33
Figura 3.	Representação gráfica da curva força-deformação obtida em teste biomecânico.....	35
Figura 4.	Força máxima dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	44
Figura 5.	Força máxima das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	45
Figura 6.	Rigidez dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	46
Figura 7.	Rigidez das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	47
Figura 8.	Resiliência dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	48
Figura 9.	Resiliência das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	49
Figura 10.	Peso úmido dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	50
Figura 11.	Peso úmido das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	51
Figura 12.	Peso de material orgânico dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	52
Figura 13.	Peso de material orgânico das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	53
Figura 14.	Volume ósseo dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	54
Figura 15.	Volume ósseo das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	55
Figura 16.	Peso das cinzas dos fêmures dos animais dos diferentes	56

	grupos experimentais.....	
Figura 17.	Peso das cinzas das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	57
Figura 18.	Densidade óssea dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	58
Figura 19.	Densidade óssea das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	59
Figura 20.	Densidade mineral dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	60
Figura 21.	Densidade mineral das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Concentração de chumbo nas tíbias direitas dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 2.	Massa corporal inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	40
Tabela 3.	Comprimento dos fêmures e altura das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	42
Tabela 4.	Correlações entre as propriedades biomecânicas dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais e seus comprimentos, peso de material orgânico, peso das cinzas, volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral.....	62
Tabela 5.	Correlações entre as propriedades biomecânicas das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais e suas alturas, peso de material orgânico, peso das cinzas, volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALAD	Ácido δ -aminolevulínico
Alt.	Altura
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Comp.	Comprimento
ρ	Densidade
DM	Densidade mineral
DO	Densidade óssea
12C	Grupo controle de 12 meses
12I	Grupo intoxicado de 12 meses
DXA	Raio-x por dupla energia
EAAC	Espectrometria de absorção atômica com chama
EPM	Erro padrão da média
Fmáx.	Força máxima
HNO₃	Ácido nítrico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
L5	Quinta vértebra lombar
MC	Massa corporal
9C	Grupo controle de 9 meses
9I	Grupo intoxicado de 9 meses
n	Tamanho da amostra
O[•]	Superóxido de oxigênio
OH[•]	Radical hidroxila
Pb	Chumbo
[Pb]	Concentração de chumbo

Pcinzas	Peso das cinzas do osso
PGE₂	Prostaglandina E ₂
Pi	Peso do osso imerso
Pm	Peso do material mineral
PMO	Peso de material orgânico
PTH	Paratormônio
PU	Peso úmido
Pu	Peso úmido do osso
%	Porcentagem
Res	Resiliência
Rig	Rigidez
SD	Desvio padrão
6C	Grupo controle 6 meses
6I	Grupo intoxicado 6 meses
SH	Sulfidrilas
3C	Grupo controle 3 meses
3I	Grupo intoxicado 3 meses
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
VO	Volume ósseo
vs	<i>versus</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Tecido ósseo.....	17
1.2	Chumbo.....	19
1.2.1	Aspectos toxicocinéticos do chumbo.....	21
1.2.1.1	Absorção.....	21
1.2.1.2	Distribuição.....	22
1.2.1.3	Biotransformação e Eliminação.....	24
1.2.2	Aspectos toxicodinâmicos do chumbo.....	24
1.3	Tecido ósseo e chumbo.....	25
2.	Objetivos.....	27
2.1	Geral.....	27
2.2	Específicos.....	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Animais.....	28
3.2	Protocolo experimental.....	28
3.3	Parâmetros analisados.....	29
3.3.1	Parâmetro químico.....	30
3.3.1.1	Concentração de chumbo.....	30
3.3.2	Parâmetros biométricos.....	31
3.3.2.1	Massa corporal.....	31
3.3.2.2	Comprimento e altura dos ossos.....	31
3.3.3	Parâmetros biomecânicos.....	31
3.3.3.1	Ensaio mecânico de flexão a três pontos.....	32
3.3.3.2	Ensaio mecânico de compressão de vértebras.....	34
3.3.4	Parâmetros biofísicos.....	35
3.4	Análise estatística.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
4.1	Parâmetro químico.....	39

4.1.1	Concentração de chumbo no osso.....	39
4.2	Parâmetros biométricos.....	39
4.2.1	Massa corporal.....	40
4.2.2	Comprimento do fêmur direito.....	41
4.2.3	Altura da quinta vértebra lombar.....	41
4.3	Parâmetros biomecânicos.....	42
4.3.1	Força Máxima.....	43
4.3.2	Rigidez.....	45
4.3.3	Resiliência.....	47
4.4	Parâmetros biofísicos.....	49
4.4.1	Peso úmido.....	49
4.4.2	Peso de material orgânico.....	51
4.4.3	Volume ósseo.....	53
4.4.4	Peso das cinzas.....	55
4.4.5	Densidade óssea.....	57
4.4.6	Densidade mineral.....	59
4.5	Correlações biomecânicas x biométricas e biofísicas.....	61
5.	DISCUSSÕES.....	64
6.	CONCLUSÕES.....	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
	APÊNDICE.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, dinâmico e vital, que proporciona a integridade mecânica necessária para a locomoção e proteção dos órgãos. E ainda, encontra-se intimamente associado à homeostase mineral, além de ser sítio primário da hematopoiese (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a).

Com a maturidade esquelética, o osso tende a remodelar-se durante toda a vida e adaptar suas propriedades materiais às sobrecargas mecânicas que recebe, visando garantir a integridade das funções do esqueleto, mantendo a sua competência biomecânica, prevenindo-o contra o acúmulo de perigosas fadigas e protegendo os componentes teciduais para que estes estejam sempre disponíveis para manter o equilíbrio mineral (MILLER, 2006; RIGGS et al., 2006).

Os ossos são constituídos de material orgânico, material mineral (ou inorgânico) e água. A fase orgânica determina a estrutura e as propriedades mecânicas ósseas e é composta de matriz óssea ou osteóide e de células próprias do tecido ósseo. A matriz óssea é formada principalmente de colágeno tipo I e outras proteínas, como os fatores de crescimento, citoquinas e proteínas da matriz extracelular (osteonectina, osteopontina, sialoproteínas ósseas, osteocalcina, proteoglicanos, fosfoproteínas e proteolipídeos), compondo 98% do material orgânico ósseo. Os 2% restantes são formados pelas células ósseas, os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea, os osteócitos, que representam os osteoblastos que ficaram circundados pela matriz mineralizada e os osteoclastos que são células

multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a).

A fase mineral (ou inorgânica) é composta principalmente de um mineral contendo fosfato e cálcio, à hidroxiapatita. As pequenas quantidades de impurezas contidas nesta apatita (como o chumbo que pode substituir cálcio) alteram algumas propriedades físicas do cristal tendo efeitos críticos sobre a função normal (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a).

A microarquitetura óssea se organiza de modo a suportar os estresses mecânicos gerados pelas atividades normais. Essa relação estrutura/função em adição ao papel na manutenção da homeostase mineral, leva ao processo de formação e reabsorção do tecido ósseo, que perdura por toda a vida do indivíduo. Esse processo é chamado de remodelação óssea. É estimado que, no tecido ósseo de adultos, aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical são renovados anualmente (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a).

Segundo Miller (2006), o processo de remodelação óssea é altamente regulado por fatores sistêmicos e locais em resposta a sinais químicos, mecânicos, elétricos e magnéticos.

O processo de remodelação óssea é cíclico e envolve os seguintes estágios: quiescência – ativação – reabsorção – reversão – formação – quiescência. Durante o estágio de quiescência, a superfície óssea encontra-se inativa com respeito ao remodelamento, sendo recoberta por uma fina camada de células de revestimento (osteoblastos modificados) (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006b). Essas células possuem receptores para fatores sistêmicos e locais, como paratormônio (PTH) e prostaglandina E_2 (PGE_2). Quando estimulada as células liberam proteases e expõem uma pequena área de matriz óssea mineralizada (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006b). A partir daí inicia-se a ativação, onde as células mononucleares do sistema fagocitário

são atraídas para esta superfície, ancorando-se e fundindo-se, originando os osteoclastos. O estágio seguinte é a reabsorção, quando os osteoclastos começam a erodir uma cavidade de forma e dimensões características denominada lacuna de Howship no osso trabecular e cone de reabsorção no osso cortical. O processo de reabsorção pode levar de 1 a 3 semanas e é seguido por um intervalo de 1 a 2 semanas, denominado reversão. É provável que os mecanismos responsáveis pelo acoplamento reabsorção-formação aconteçam nesta fase. Em seguida tem início o estágio de formação, onde os osteoblastos sintetizam a matriz óssea que posteriormente é mineralizada, a cavidade produzida pelos osteoclastos é preenchida e a superfície óssea retorna à quiescência. A duração do estágio de formação é de aproximadamente 3 meses e o ciclo de remodelação óssea leva aproximadamente 4 meses para ser completado, porém um período de 3 a 6 meses é requerido para o osso tornar-se plenamente maduro (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006b).

A afinidade entre o chumbo e osso se deve à similaridade de sua valência com a do cálcio. O conteúdo de chumbo no esqueleto não é distribuído homogeneamente, existindo duas frações distintas, uma nos ossos trabeculares e outra nos ossos corticais. (SMITH et al., 1995).

1.2 Chumbo

Chumbo (Pb) é um metal de ocorrência natural na crosta terrestre, classificado como tóxico. Este metal foi um dos primeiros a ser manipulado pelo homem por possuir características como baixo ponto de fusão, durabilidade, ductibilidade e facilidade em formar ligas metálicas (SHEETS, 1998).

O chumbo pode ser usado em sua forma pura ou formando compostos com outros elementos químicos. A utilização do chumbo remonta de tempos pré-históricos. Entretanto,

foi a partir da revolução industrial que o chumbo começou a ser utilizado em larga escala. Desde então, a contaminação por chumbo tornou-se um problema de saúde pública. O uso extensivo do chumbo pela indústria tem liberado cerca de 300 milhões de toneladas do metal para o ambiente, sendo os últimos 500 anos responsáveis pela maior parte desta poluição (TONG; SCHIRNDING; PRAPAMONTOL, 2000).

Os principais setores de utilização do chumbo são fabricação e reforma de baterias chumbo-ácidas, reparadoras de radiadores, fundições secundárias e refino de metais, onde os trabalhadores sofrem altos níveis de exposição. Nos países em desenvolvimento, a fabricação de baterias em pequena escala ou operações de reparos são responsáveis pela maioria das intoxicações ocupacionais por chumbo notificadas (GOLDSBERG et al., 1997).

A exposição ao chumbo é caracterizada como ocupacional quando decorre da utilização do metal em alguma etapa do processo de trabalho. Segundo Hipkins et al. (1998), podem ser quantificadas mais de 200 atividades envolvendo a exposição de trabalhadores ao chumbo. E, paralela à exposição ocupacional, verifica-se a exposição de populações circunvizinhas às fábricas emissoras do metal para o ambiente (CANDELA; FERRI; OLMI, 1998). Estas populações exibem níveis de chumbo em sangue mais elevados que as populações não expostas (IZMEROV, 1998). A exposição ao chumbo também pode ocorrer durante atividades como a demolição e restauração de construções velhas, cujas tintas contenham o metal em sua composição.

O chumbo pode ser encontrado no ar, na água de beber, nos rios, lagos e oceanos, na poeira, no solo e na cadeia alimentar. Portanto a exposição ambiental ao chumbo pode ocorrer pela ingestão de comida ou água contaminada, por contato com tintas contendo o metal, pelo ar ou poeira contaminado, sendo algumas vezes provenientes de múltiplas fontes (ATSDR, 2007; KELADA; SHELTON; KAUFMANN-KHOORY, 2001).

O chumbo foi amplamente empregado como aditivo da gasolina (Pb tetraetila) até o ano de 1992, quando seu uso foi banido na maioria dos países. Da mesma forma, a quantidade de chumbo acrescida a determinados produtos como tintas, tem sido reduzida nos últimos anos com objetivo de minimizar a exposição (ATSDR, 2007; PAOLIELLO; De CAPITANI, 2007).

Nos últimos vinte anos, os níveis de exposição, e, conseqüentemente, os valores de chumbo sanguíneo da população, em geral, vêm decaindo significativamente devido às medidas de controle (LIPPMANN, 1990; ATSDR, 2007). Mas não obstante às restrições quanto ao uso e à redução dos níveis aceitáveis de chumbo no ambiente de trabalho, a exposição ao metal representa, ainda, um sério problema de saúde ocupacional e ambiental, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (ATSDR, 2007; FREITAS et al., 2007; PAOLIELLO; De CAPITANI, 2007).

1.2.1 Aspectos toxicocinéticos do chumbo

1.2.1.1 Absorção

A absorção do chumbo é determinada por sua espécie química, suas características físico-químicas e pela dose, frequência, duração e via da exposição, podendo ser influenciada por fatores como idade, sexo, estilo de vida, estado fisiológico e nutricional, e ainda, pela susceptibilidade individual do organismo exposto (ALEXANDER et al., 1998).

O chumbo pode ser absorvido por diversas vias, principalmente através dos tratos respiratório e gastrointestinal. No caso das exposições ocupacionais, a via respiratória constitui-se na mais importante, enquanto a via digestiva tem maior representatividade em exposições ambientais (ATSDR, 2007). A absorção pela via respiratória é determinada, dentre outros fatores, pela concentração do metal no ambiente, tamanho da partícula e pela ventilação pulmonar. Partículas com diâmetros aerodinâmicos acima de 5 μm são, geralmente, depositadas nas vias aéreas superiores, removidas pelo mecanismo mucociliar e ingeridas, podendo ser absorvidas pelo trato gastrintestinal. A maioria das partículas menores que 1 μm (fumos e vapores de chumbo) são depositadas e absorvidas na região alveolar do pulmão. A absorção de chumbo pela via dérmica é mínima, salvo se houver ferida local (ATSDR, 2007).

1.2.1.2 Distribuição

Uma vez absorvido, o chumbo se distribui rapidamente entre sangue e tecidos moles, de acordo com a intensidade da perfusão sanguínea destes tecidos. No sangue, cerca de 95% do metal encontra-se associado aos eritrócitos, seja na superfície externa da membrana ou no meio intracelular ligado à proteínas, como o ácido δ -aminolevulínico (ALAD) e a hemoglobina (SIMONS, 1993). Os demais 5% de chumbo podem ser encontrados no plasma, de forma livre ou associado à albumina, à γ -globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo sulfidrilas (SH) (cisteína, hemocisteína e cisteamina), constituindo a fração potencialmente tóxica do metal, que é capaz de alcançar demais diversos tecidos (AL-MODHEFER; BRADBURY; SIMMONS, 1991).

Nos tecidos moles - cérebro, fígado, rim e baço - o chumbo permanece, predominantemente, ligado às proteínas. Os complexos formados pelo chumbo e proteínas ácidas são denominados corpos de inclusão intranucleares, e podem ser observados em células do túbulo renal proximal de indivíduos que apresentam neuropatia induzida pelo metal (BELLINGER; LEVITON; WATUNAUX, 1987; FOWLER, 1989).

O chumbo é redistribuído de acordo com sua afinidade pelos tecidos. Em casos de exposição crônica, cerca de 95% da carga corpórea de chumbo acumula-se nos ossos, onde sua meia-vida é em torno de 20 a 30 anos (BARRY, 1975). Apesar da complexidade da distribuição farmacocinética do chumbo no corpo, é fato que o tecido ósseo constitui o principal sítio de estocagem de longo termo, de onde o metal pode ser mobilizado, levando o organismo a uma exposição sistêmica continuada (SMITH et al., 1995).

Alguns modelos teóricos têm sido propostos para a distribuição do chumbo no organismo. Um desses é o modelo clássico de Rabinowits (1976), que baseado em estudos cinéticos com isótopos estáveis de chumbo (Pb_2O_4), propõe um modelo tricompartmental. No primeiro compartimento, contendo cerca de 4% da carga corpórea total do chumbo, há um rápido fluxo entre o sangue, fluídos biológicos e tecidos moles com meia-vida de aproximadamente 30 dias. No segundo, onde o chumbo apresenta meia-vida de 40 dias a um ano, ocorre um intercâmbio mais lento entre tecidos moles e ossos. O terceiro é formado somente pelo tecido ósseo, onde o tempo de permanência do metal pode ser de quase 30 anos.

Agentes quelantes têm sido usados terapeuticamente para extrair o chumbo dos tecidos. Estes agentes também são utilizados em estudos sobre estimativas da carga corpórea do metal (GOYER, 1997).

O chumbo possui a capacidade de atravessar a barreira transplacentária. Portanto, a exposição da criança ao metal pode ter início ainda na vida intra-uterina, além de pode ser transferido para a criança através do leite materno (ONG; CHIA; FOO, 1993).

A barreira hematoencefálica também pode ser atravessada pelo chumbo. A distribuição pelo sistema nervoso é desigual, com altos níveis no hipocampo e amígdala (SKERFVING et al., 1993).

1.2.1.3 Biotransformação e Eliminação

O chumbo inorgânico não sofre biotransformação no organismo, mas pode formar complexos reversíveis com proteínas, aminoácidos e pequenos peptídeos tionados. Os compostos orgânicos de chumbo podem ser transformados em metabólitos altamente neurotóxicos (BARRY, 1975).

A eliminação do chumbo ocorre principalmente pela via renal, através dos processos de filtração glomerular e reabsorção tubular (ARAKI; SATA KATSUYUKI, 1990). O fluxo urinário pode afetar a excreção urinária do chumbo, segundo o ritmo circadiano. O chumbo pode ser excretado também pela via biliar, possivelmente, complexado à glutatona (SKERFVING et al., 1993).

1.2.2 Aspectos toxicodinâmicos do chumbo

O chumbo apresenta um amplo espectro de efeitos adversos sobre o organismo, afetando os sistemas cardiovascular, neurológico, gastrintestinal, hematológico, renal e

reprodutor. Também está associado ao aumento da pressão arterial e alterações dos níveis séricos da vitamina D (ATSDR, 2007). Além do mais, é possível que o chumbo também exerça atividade mutagênica e carcinogênica (SKERFVING et al., 1993).

A intoxicação por chumbo é denominada Saturnismo ou plumbismo, cujos sinais e sintomas clássicos são: dor abdominal, fadiga, sonolência, cefaléia inespecífica, dores articulares, irritabilidade, impotência sexual, depressão, anorexia, mialgia, tremores, alterações do ritmo intestinal, hipertensão arterial sistêmica e perda de peso (ATSDR, 2007).

O mecanismo de ação do chumbo ocorre por sua ligação aos grupamentos funcionais de determinadas proteínas (ATSDR, 2007). A interação chumbo-proteína pode acarretar interferências em vias metabólicas importantes, inibição do transporte ativo e aumento da permeabilidade passiva da célula.

1.3 Tecido Ósseo e chumbo

O impacto dos danos provocados pelo chumbo sobre a densidade mineral óssea tem sido bastante estudado ao longo dos anos (BARRY, 1975; GONZALEZ-RIOLA et al. 1997; HAMILTON; O'FLAHERTY, 1995; MESTEK; DEYL; MIKSIK, 1998; RABINOWITZ, 1991). A incorporação do chumbo na matriz óssea ocorre durante a calcificação (GONZALEZ-RIOLA et al., 1997), seu acúmulo no esqueleto pode começar durante o desenvolvimento fetal e continuar ao longo da vida, alojando-se em áreas do crescimento e mineralização óssea (BARRY, 1975; GONZALEZ-RIOLA et al., 1997; HAMILTON; O'FLAHERTY, 1995; MESTEK; DEYL; MIKSIK, 1998; RABINOWITZ, 1991). Segundo Pounds et al. (1991), o chumbo acumulado no esqueleto tem efeitos diretos sobre a função

dos osteoblastos, e ainda, pode intoxicar tanto o esqueleto animal quanto o humano causando perturbações do desenvolvimento, formação e reabsorção óssea. O rato pode fornecer bons modelos para estudos sobre importantes problemas relacionados ao esqueleto humano, embora não haja animal que atenda todos os requisitos de um modelo ideal (FROST; JEE, 1992; KALU, 1991).

Para Escribano et al. (1997), o chumbo não afeta o crescimento longitudinal e periférico de ossos longos, mas afeta o desenvolvimento do esqueleto axial. Ronis; Aronson e Gao (2001), verificaram que ratos expostos ao chumbo durante seu desenvolvimento apresentaram deficiência do crescimento corporal. Em humanos, os resultados obtidos por Latorre; Hernández-Avila e Orozco, (2003), suportam a hipótese de que a liberação de estoques de chumbo ósseo aumenta durante a pós-menopausa e constitui uma fonte de exposição interna associada a enfermidades.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da intoxicação com chumbo durante a fase prépuberal de ratas. Para tal, parâmetros bioquímicos, biométricos, biomecânicos, biofísicos de fêmures e vértebras de ratas em vários estágios de maturidade foram analisados.

2.2 Específicos

- Observar o crescimento ponderal das ratas dos diferentes grupos experimentais.
- Verificar a eficácia do procedimento metodológico utilizado para promover a incorporação do chumbo ao tecido ósseo.
- Verificar se a influência do chumbo sobre o tecido ósseo é tempo-dependente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

No experimento foram utilizadas 64 ratas Wistar, com um mês de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento realizou-se no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. As ratas foram mantidas no biotério deste laboratório, em um regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlados ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentados com ração comercial e água “ad libitum”. Os animais foram pesados semanalmente. Este protocolo experimental com modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFSCar - Protocolo nº 056/2007.

3.2 Protocolo Experimental

O experimento teve início com os animais com 1(um) mês de vida. As ratas foram tratadas uma vez por semana, via gavagem gástrica, com 100mg de acetato de chumbo/ Kg de massa corporal (CELIK; ÖGENLER; ÇOMELEKOGLU, 2005; SMITH Jr.; MIELKE; HENEGHAN, 2009; UNGVÁRY, 2002) ou salina 0,9% (0,1ml/100g MC) durante um período de 2 (dois) meses. A eutanásia foi realizada por decapitação em tempos diferentes (3

meses, 6 meses, 9 meses e 12 meses de vida) e os fêmures, tíbias e vértebras dos animais foram dissecados e mantidos em salina a - 20°C até o início das análises. O delineamento experimental está esquematizado na figura 1.

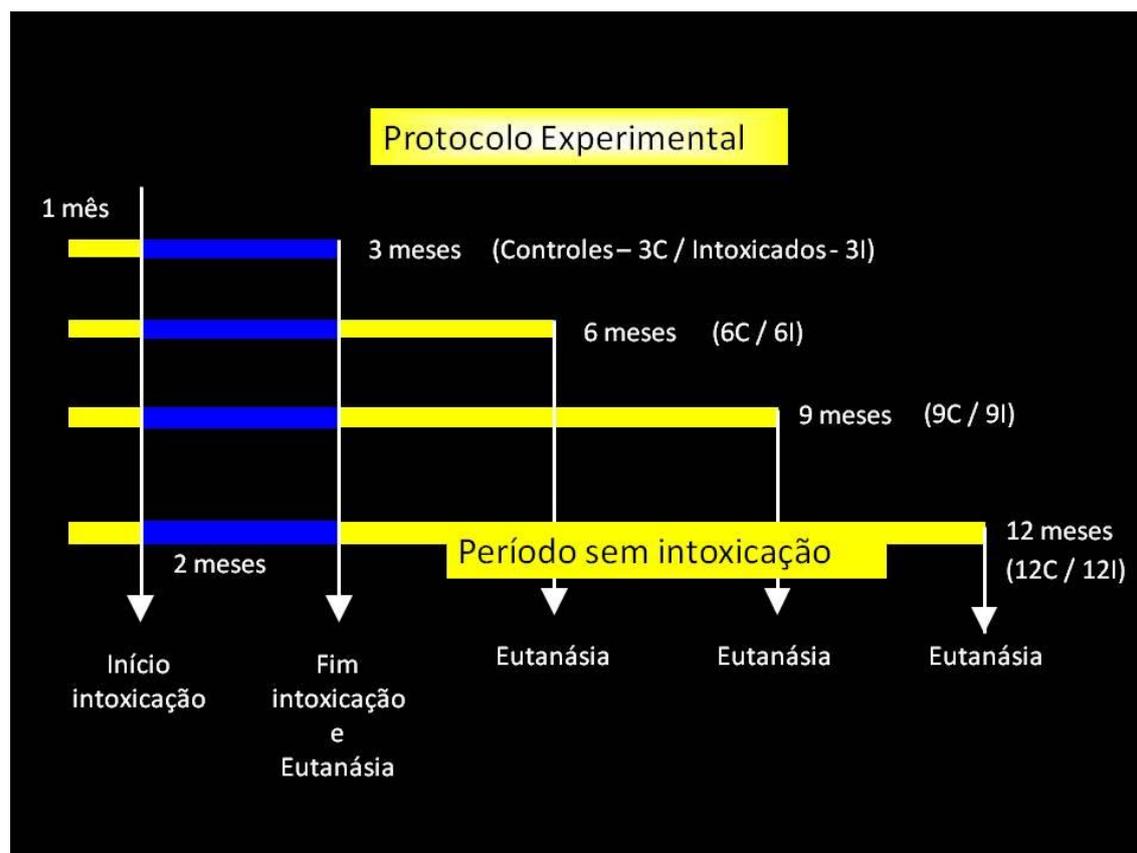


Figura 1. Protocolo experimental

3.3 Parâmetros Analisados

Para o estudo dos efeitos provocados pela intoxicação de chumbo sobre a qualidade óssea dos fêmures direitos e quintas (5^a) vértebras lombares (L5) das ratas, foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: *parâmetro químico* - concentração de chumbo [Pb] em tíbias direitas; *parâmetros biométricos* - peso corporal (PC) (inicial e final), comprimento do fêmur direito; altura da L5; *parâmetros biomecânicos* – força máxima (FM_{ax}), rigidez (Rig) e resiliência (Res); *parâmetros biofísicos* – peso úmido (PU), peso de material orgânico (PMO), volume ósseo (VO), peso das cinzas (Pcinzas), densidade óssea (DO), densidade mineral (DM). Tais parâmetros serão descritos individualmente a seguir.

3.3.1 Parâmetro químico

3.3.1.1 Concentração de chumbo

A concentração de chumbo foi determinada por espectrometria de absorção atômica com chama (EAAC) em tíbias direitas (uma amostra controle e uma de cada grupo intoxicado), para confirmar a incorporação do chumbo no tecido ósseo. As amostras foram diluídas com HNO₃ (7 mol l⁻¹), (Merck, Darmstadt, Alemanha) e H₂O₂ (30% v v⁻¹) (Mallinckrodt, México), até sua total decomposição. As soluções de referência foram preparadas após sucessivas diluições de 1000 mg l⁻¹ da solução mãe de Pb Tritisol[®] Merck (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado um espectrofotômetro Spectra AA-640 Varian, operando em um comprimento de onda de 283,3 nm com uma corrente de 10,0 mA, com lâmpada de Deutério para a leitura das amostras.

3.3.2 Parâmetros biométricos

3.3.2.1 Massa Corporal

A Massa Corporal (g) de cada animal dos diferentes grupos experimentais foi verificada semanalmente, tanto para a correção do volume da droga ou do veículo, como para a monitoração do crescimento e da saúde dos animais.

3.3.2.2 Comprimento e Altura dos ossos

O Comprimento (mm) e Altura (mm) são medidas dos fêmures e das vértebras, respectivamente, mensuradas por paquímetro.

3.3.3 Parâmetros biomecânicos

A força máxima (N), rigidez (N/mm) e resiliência (J) foram os parâmetros biomecânicos utilizados para avaliar as propriedades mecânicas dos fêmures e das vértebras. Estes parâmetros foram obtidos através de ensaios mecânicos de flexão a três pontos (nos fêmures) e de compressão (nas vértebras), realizados em uma máquina universal Instron,

modelo 4444, em temperatura ambiente (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG et al., 1994).

3.3.3.1 Ensaio mecânico de flexão a três pontos

No teste de flexão a três pontos, as extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes, com diâmetros de 3,0mm, suportados por apoios distanciados de 21,70mm. A força foi aplicada utilizando uma célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1KN. Esta força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior, no ponto médio entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com o rolete de 3,0 mm fixada na sua extremidade, a uma velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento de ruptura do osso. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através do programa Instron Series IX. (AKHTER et al., 2004) (figura 2).



Figura 2. Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste de flexão a três pontos em fêmur de rata. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria.

3.3.3.2 Ensaio mecânico de compressão de vértebras

No teste de compressão das vértebras, as extremidades do corpo vertebral foram previamente lixadas para a obtenção de superfícies planas, e colocadas sobre um suporte plano para receberem a carga de compressão. Esta carga foi aplicada utilizando uma célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1KN. A carga foi aplicada no sentido crânio-caudal por uma haste com extremidade plana em uma velocidade constante de 2 mm/min até a compressão de dois terços da altura de cada amostra.

Foram obtidas as curvas de força-deformação para os ensaios e os parâmetros relacionados a seguir foram analisados.

Força Máxima (N) – (F_{máx})

Caracteriza a maior força aplicada no ensaio, também conhecida como última força (figura 3).

Rigidez (N/mm) – (Rig)

Obtida através da inclinação da reta (R) ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica (figura 3).

Resiliência (J) – (Res)

Determinada pela área sob a curva força-deformação até o limite elástico (figura 3).

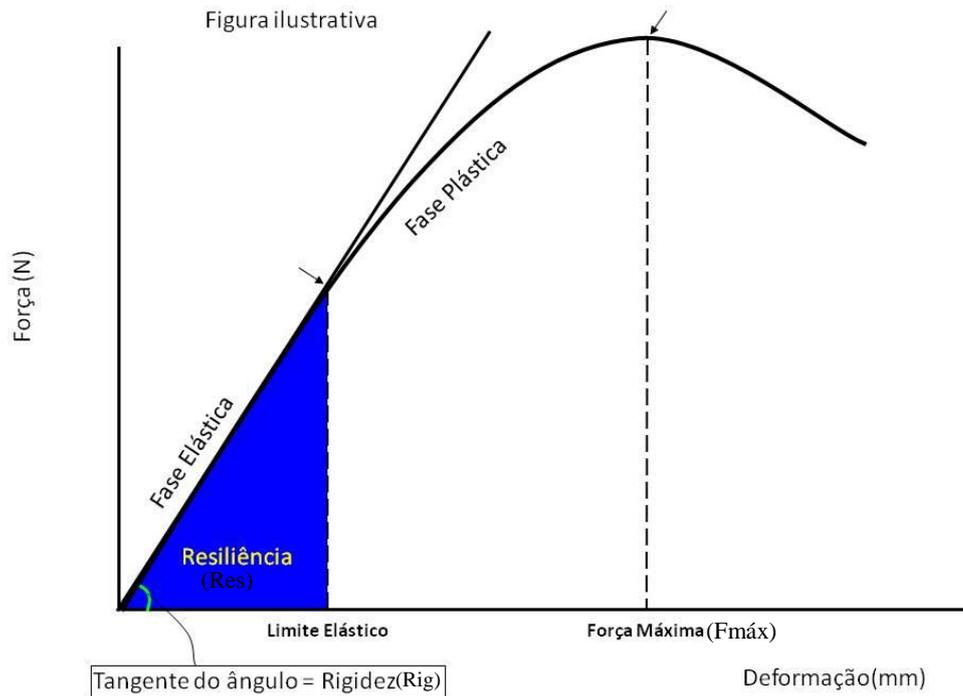


Figura 3. Representação gráfica da curva força-deformação obtida com o teste de flexão a três pontos dos fêmures e compressão das vértebras de ratas. Estão assinaladas as propriedades biomecânicas analisadas neste estudo. Força máxima (Fmáx), rigidez (Rig - inclinação da reta), resiliência (Res).

3.3.4 Parâmetros biofísicos

Os fêmures e as vértebras foram mantidos em água destilada e colocados no dessecador durante 24 horas com a finalidade de retirar o ar dos poros ósseos.

Os seguintes parâmetros foram verificados: Peso imerso (P_i) e peso úmido (P_u). A seguir, os ossos foram desidratados em uma estufa (marca Funbec) a 100°C , durante 24 horas, obtendo-se assim o peso seco (O_s).

Para obtenção do peso das cinzas (P_m), os ossos foram colocados em uma mufla a 800°C durante 24 horas. Para tais mensurações foi utilizada uma balança eletrônica (marca Chyo). O peso de material orgânico (PMO) foi obtido através da diferença entre o peso seco e o peso das cinzas.

O volume ósseo foi calculado seguindo o Princípio de Arquimedes. A densidade mineral e óssea dos fêmures foram calculadas a partir das equações abaixo descritas. Segundo (KEENAN et al., 1997), a análise do volume ósseo pelo princípio de Arquimedes é equivalente à análise feita através da densitometria de raio-X por dupla energia (DXA).

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

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

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

Onde:

P_m – Peso do Material Mineral (g)

P_u – Peso Úmido do Osso (g)

P_i – Peso do Osso Imerso (g)

ρ - Densidade da Água (g/cm^3)

3.4 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como MÉDIA \pm EPM, comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância ANOVA/MANOVA seguido do teste de Duncan's multiple range aplicados pelo programa Statistica. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Normas Técnicas referentes à elaboração deste trabalho

A estrutura geral deste trabalho, bem como as referências bibliográficas e citações, seguem a NBR 6024 e 14724 de dezembro de 2005, de autoria da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetro químico

4.1.1 Concentração de chumbo no osso (ng Pb/ Mg osso)

A concentração de chumbo determinada por espectrometria de absorção atômica com chama detectou valor nulo para a concentração de chumbo na tíbia do animal controle e valores elevados nas tíbias dos animais intoxicados dos grupos 3, 6, 9 e 12 meses (tabela 1).

Tabela 1. Concentração de Pb nas tíbias direitas dos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupos	C	3I	6I	9I	12I
[Pb] (39G/L)	<LD*	72	134	21	26

*abaixo do limite de detecção (3,86 mg/L)

4.2 Parâmetros biométricos

4.2.1 Massa Corporal

As massas corporais inicial e final não se mostraram diferentes quando comparados os grupos intoxicados com seus respectivos controles. A massa corporal final dos animais controles aumentou gradualmente com a idade, estabilizando aos 9 meses e nos intoxicados houve um aumento gradual até os 12 meses não mostrando estabilização (tabela 2).

Tabela 2: Massa corporal (MC) inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Parâmetros	
	MC inicial (g)	MC final (g)
3C (n=07)	67,57 ± 2,19	236,86 ± 6,17
3I (n=10)	69,50 ± 2,25	229,00 ± 2,65
6C (n=07)	71,57 ± 2,36	281,57 ± 7,11 ³
6I (n=08)	66,50 ± 2,99	278,50 ± 3,28 ³
9C (n=07)	66,14 ± 2,14	320,43 ± 7,55 ^{3,6}
9I (n=07)	60,43 ± 1,46 ³	298,57 ± 7,26 ³
12C (n=08)	66,25 ± 1,71	323,00 ± 8,04 ^{3,6}
12I (n=10)	63,50 ± 2,07	327,50 ± 12,72 ^{3,6,9}

Média ± EPM, n=7-10; ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses.

4.2.2 Comprimento do fêmur direito (mm)

O comprimento dos fêmures dos animais controles e intoxicados, aumentou gradualmente com a idade, estabilizando aos 9 meses. No entanto, a intoxicação com chumbo retardou o crescimento dos fêmures dos animais do grupo 9 meses, sendo 2,7% menor que o seu respectivo controle (tabela 3).

4.2.3 Altura da 5^a vértebra lombar (L5) – (mm)

A altura das vértebras, tanto nos animais controles quanto nos intoxicados, aumentou gradualmente com a idade, ocorrendo de forma acentuada nos controles e mostrando apenas um discreto aumento nos animais intoxicados. A altura da L5 dos animais intoxicados do grupo 3 meses mostrou-se 8,53% maior quando comparada com seus respectivos controles (tabela 3).

Tabela 3: Comprimento dos fêmures e altura das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Idade	Controle		Intoxicado	
	Fêmur	L5	Fêmur	L5
3 meses	32,69 ± 0,3530	5,86 ± 0,1040	33,01 ± 0,1746	6,36 ± 0,0705 ^C
6 meses	36,23 ± 0,3950 ³	6,66 ± 0,1338 ³	35,98 ± 0,2214 ³	6,82 ± 0,1915 ³
9 meses	37,20 ± 0,2157 ^{3,6}	7,06 ± 0,1373 ^{3,6}	36,17 ± 0,2572 ^{C,3}	6,88 ± 0,1154 ³
12 meses	36,55 ± 0,2370 ³	7,20 ± 0,1309 ^{3,6}	36,70 ± 0,2618 ³	6,98 ± 0,1044 ³

Média ± EPM, n=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses.

4.3 Parâmetros biomecânicos

Os testes de flexão a três pontos do fêmur e o de compressão de vértebras revelaram que a exposição ao chumbo reduziu as propriedades mecânicas destes ossos de ratas adultas maduras, indicando redução da resistência do tecido ósseo.

4.3.1 Força máxima (N)

No teste de flexão a três pontos dos fêmures dos animais controles e intoxicados, a força máxima aumentou gradualmente com a idade, estabilizando aos 9 meses nos controles e aos 6 meses nos intoxicados. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, a força máxima foi menor nos grupos 6, 9 e 12 meses (figura 4).

No teste de compressão das vértebras, o efeito da idade não foi evidente nos animais controles, e nos animais intoxicados a estabilização da resposta ocorre aos 6 meses. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, apenas o grupo 9 meses mostrou uma redução da força máxima (figura 5).

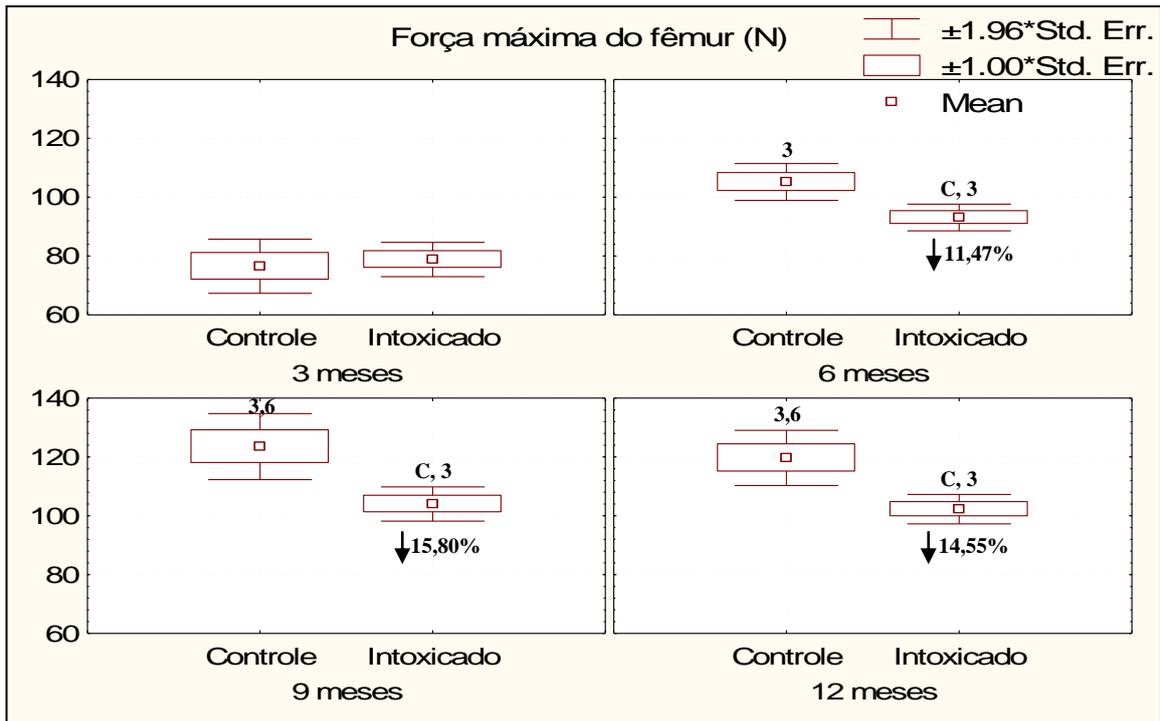


Figura 4. Média \pm EPM da força máxima dos fêmures de ratas dos diferentes grupos experimentais, obtidos no teste de flexão a três pontos. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

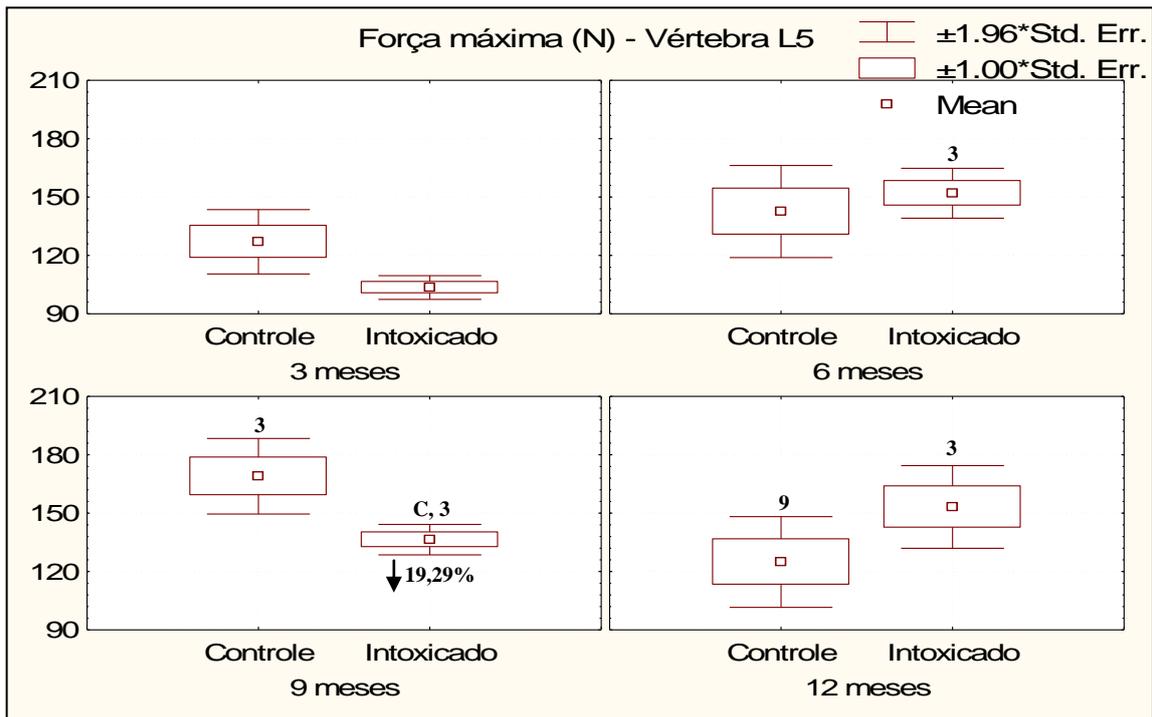


Figura 5. Média \pm EPM da força máxima das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos no teste de compressão. $N=7-10$; ^C $p < 0,05$ vs respectivo controle, ³ $p < 0,05$ vs 3 meses, ⁹ $p < 0,05$ vs 9 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

4.3.2 Rigidez (N/mm)

No teste de flexão a três pontos dos fêmures dos animais controles e intoxicados, a rigidez aumentou gradualmente com a idade até o nono mês, quando então se estabiliza. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, a rigidez foi menor nos grupos 6 e 9 meses (figura 6).

No teste de compressão das vértebras, o efeito da idade não fica evidente nos animais controle nem nos intoxicados. No grupo intoxicado 9 meses a rigidez é menor em relação ao seu controle (figura 7).

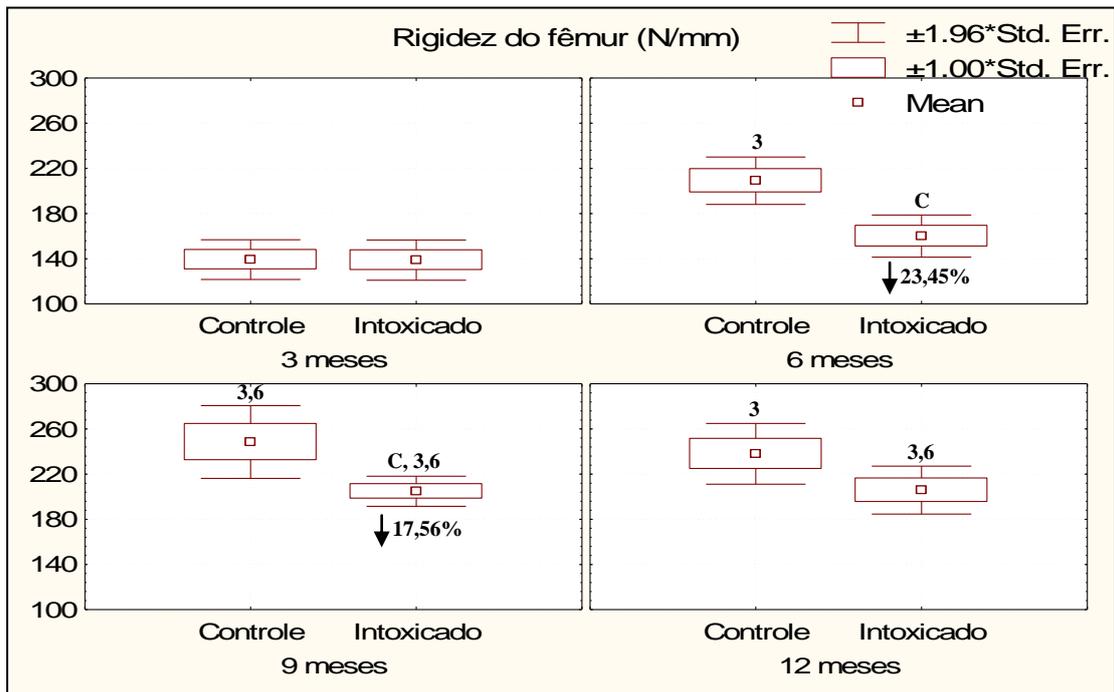


Figura 6. Média \pm EPM da rigidez dos fêmures de ratas dos diferentes grupos experimentais, obtidos no teste de flexão a três pontos. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

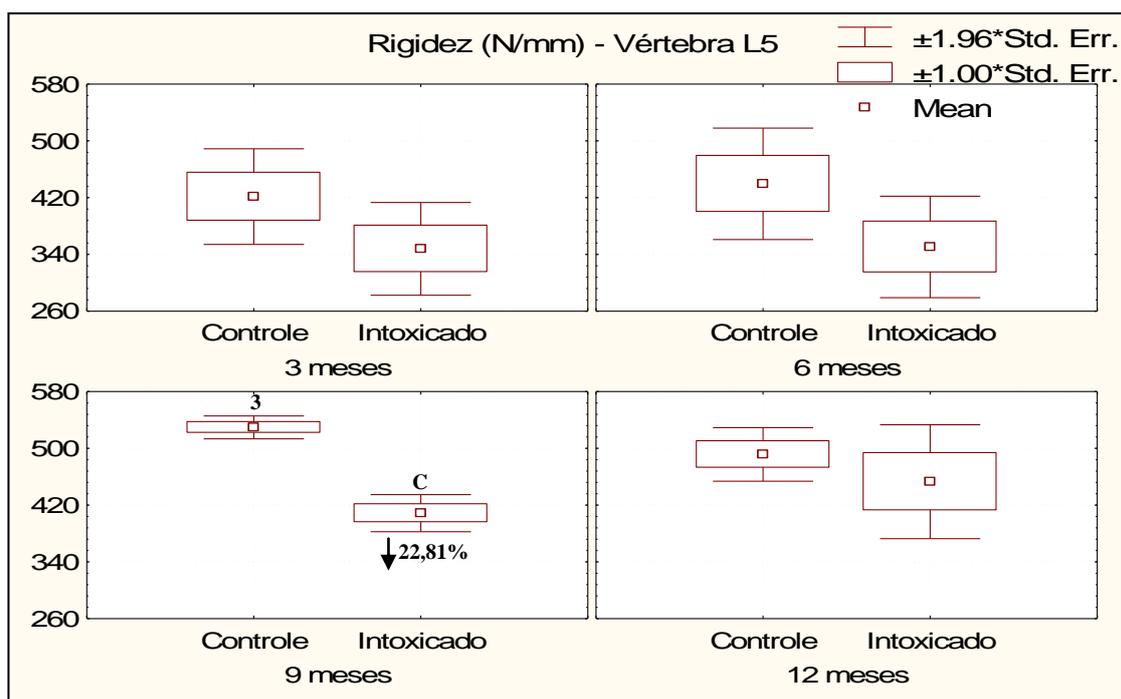


Figura 7. Média \pm EPM da rigidez das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos no teste de compressão. N=7–10; ^C $p < 0,05$ vs respectivo controle, ³ $p < 0,05$ vs 3 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

4.3.3 Resiliência (J)

No teste biomecânico dos fêmures, observa-se o efeito da idade nos animais controles até os 9 meses, quando estabiliza e tal efeito não é observado nos grupos intoxicados. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, a resiliência foi menor nos grupos 9 e 12 meses (figura 8).

No teste de compressão das vértebras, os efeitos da idade e da intoxicação sobre a resiliência não são observado (figura 9).

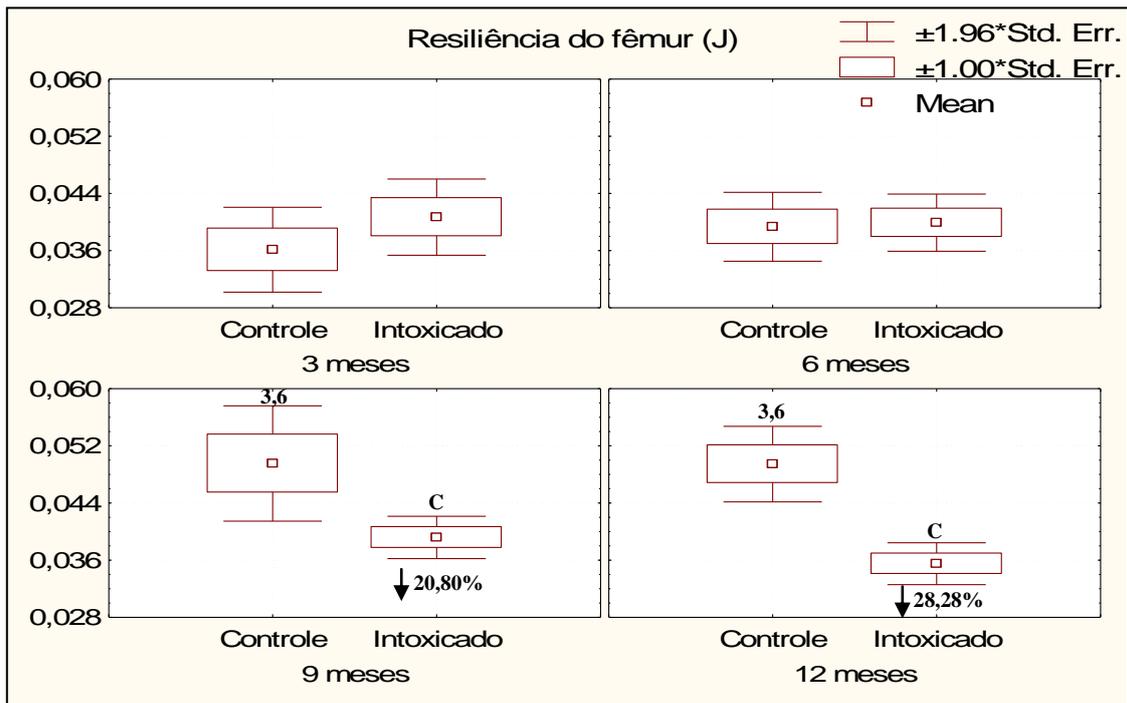


Figura 8. Média \pm EPM da resiliência dos fêmures de ratas dos diferentes grupos experimentais, obtidos no teste de flexão a três pontos. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

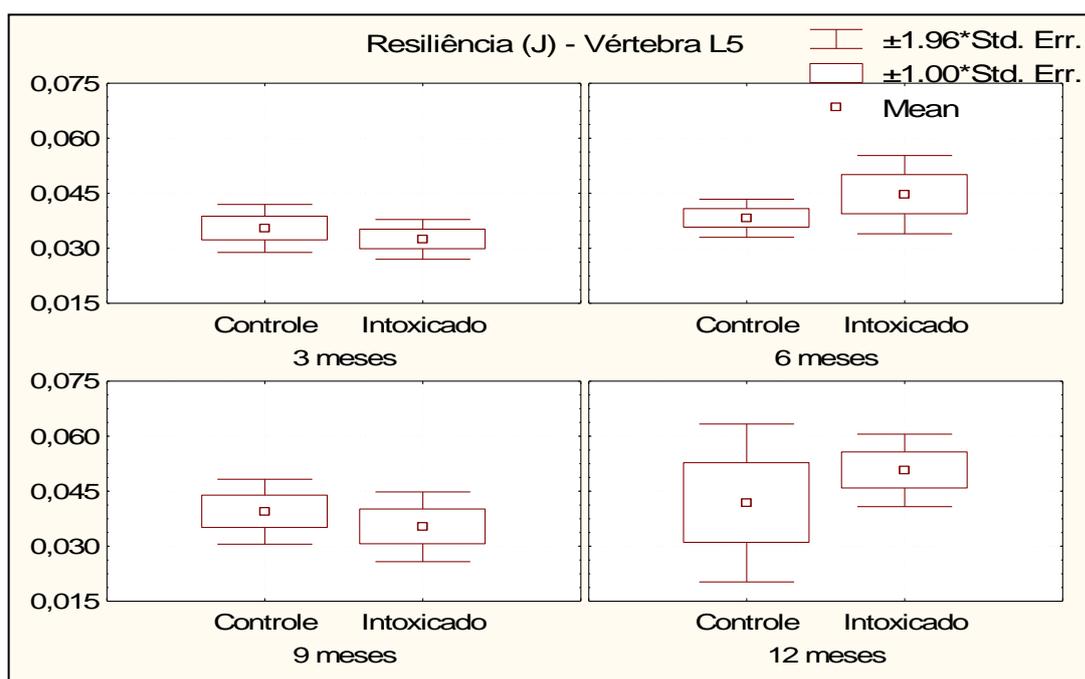


Figura 9. Média \pm EPM da resiliência das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos no teste de compressão. N=7-10.

4.4 Parâmetros biofísicos

4.4.1 Peso úmido (g)

O peso úmido dos fêmures dos animais controles e intoxicados aumentou gradualmente até os 9 meses, quando se estabiliza. Fazendo uma comparação entre grupos dos animais intoxicados, o peso úmido do grupo 12 meses foi aproximadamente 6,69% maior do

que o do grupo 6 meses. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, o grupo 9 meses reduziu o peso úmido em 8,91%. (figuras 10).

Nas vértebras, o peso úmido dos animais controles e intoxicados aumentou gradualmente até os 6 meses, quando se estabiliza (figura 11).

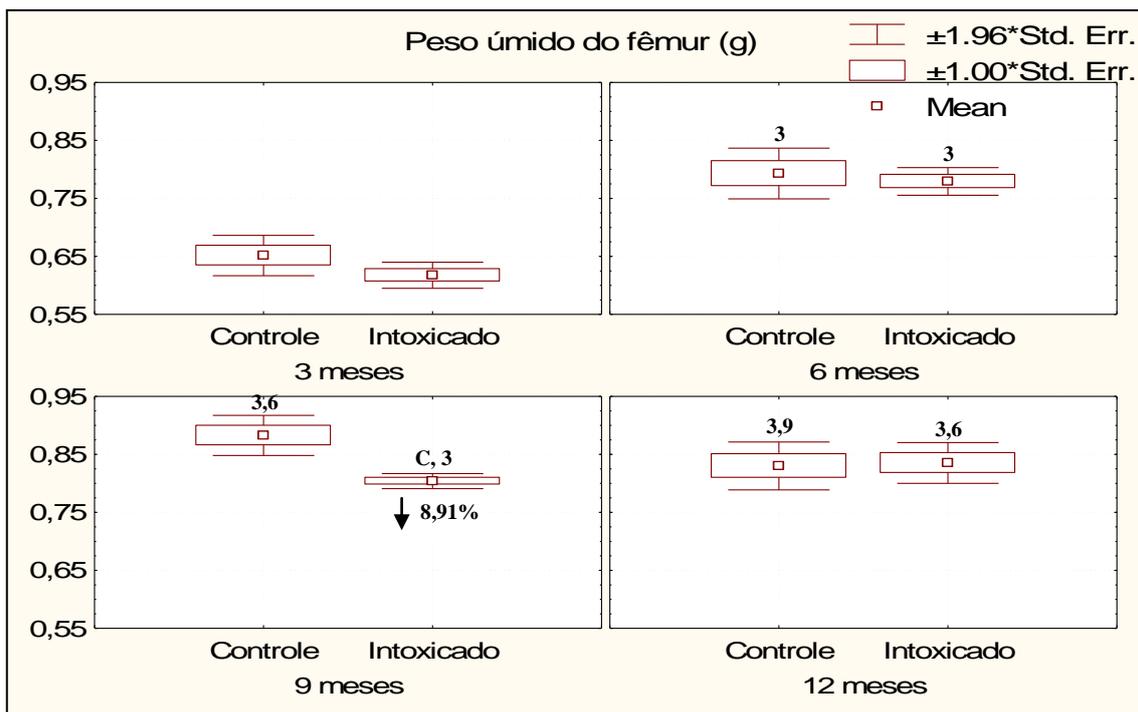


Figura 10. Média \pm EPM do peso úmido dos fêmures das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

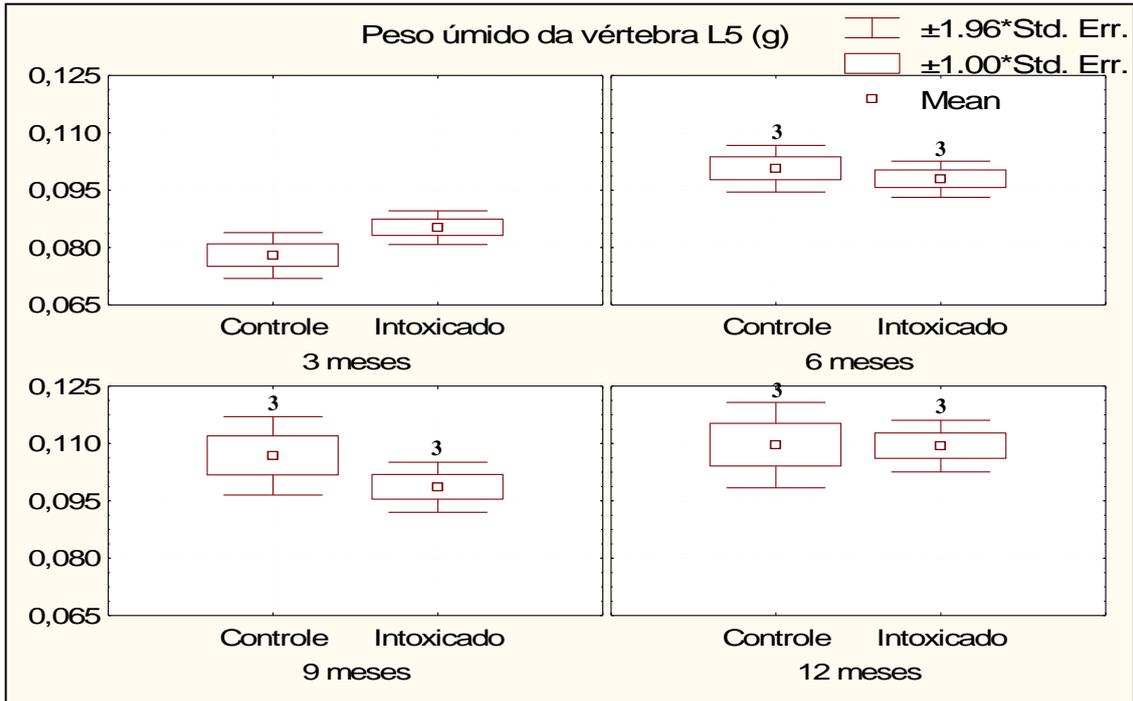


Figura 11. Média \pm EPM do peso úmido das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ³ p < 0,05 vs 3 meses.

4.4.2 Peso de material orgânico (g)

O peso de material orgânico dos fêmures dos animais controles e intoxicados, aumentou gradualmente com a idade, estabilizando aos 9 meses nos controles e aos 6 meses nos intoxicados. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, os grupos 3 e 9 meses tiveram o peso de material orgânico reduzido em 12,98 % e 9,96%, respectivamente (figura 12).

O efeito da idade sobre o peso de material orgânico das vértebras dos controles mostrou um platô entre 3-6 meses, aumentando até os 9 meses, quando estabilizou. Nos animais intoxicados, o platô ocorreu entre os 3-9 meses, a partir daí houve um discreto aumento até os 12 meses (figura 13).

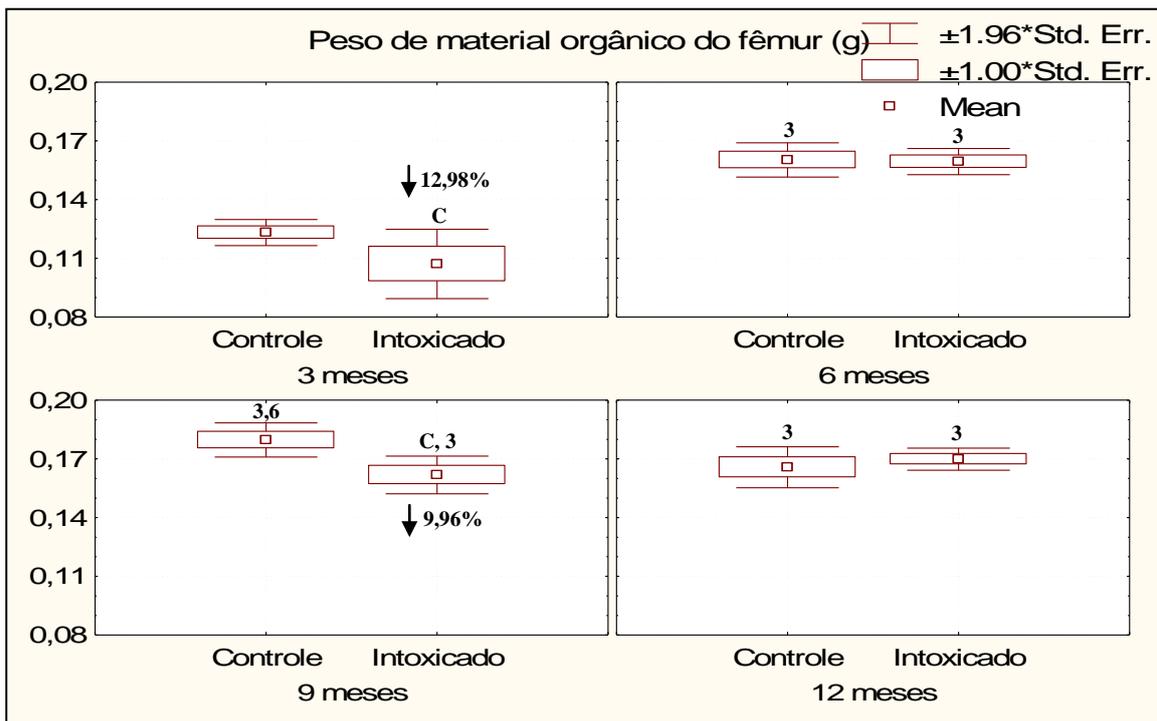


Figura 12. Média \pm EPM do peso de material orgânico de fêmures das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

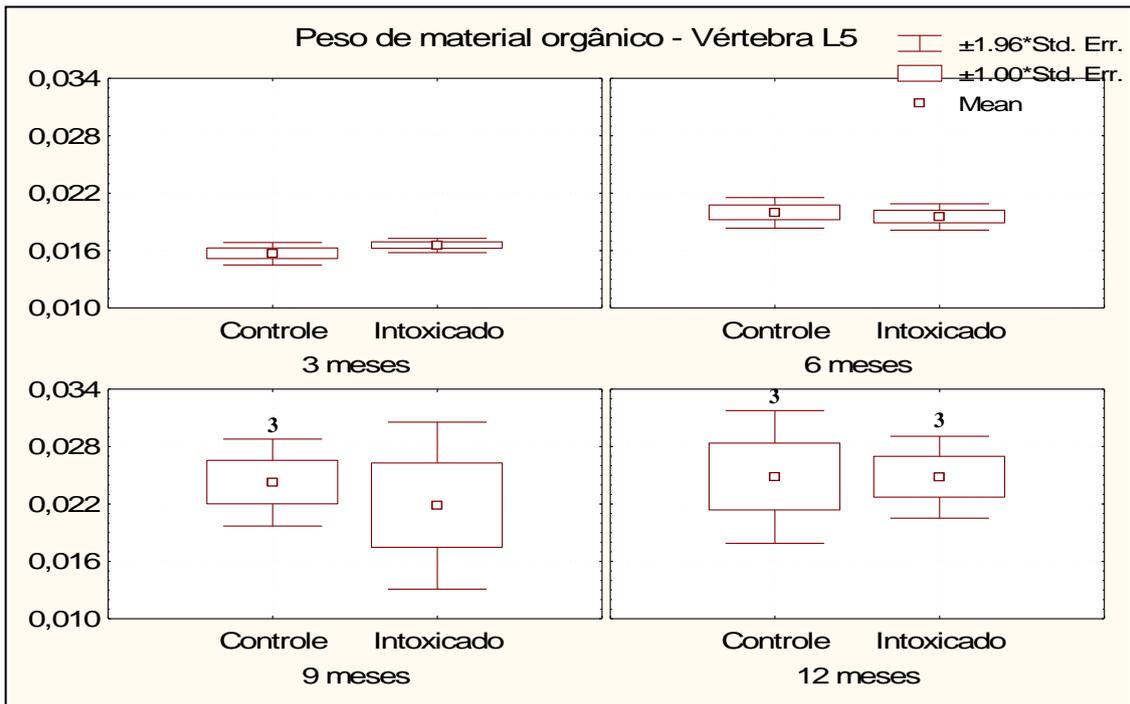


Figura 13. Média \pm EPM do peso de material orgânico das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais, $n=7-10$; ³ $p < 0,05$ vs 3 meses.

4.4.3 Volume ósseo (cm³)

O volume ósseo dos fêmures dos animais controles e intoxicados aumentou gradualmente com a idade estabilizando aos 9 meses. Nos animais intoxicados dos grupos 9 e 12 meses foram 6,34% e 9,53% maior do que o do grupo 6 meses, respectivamente, e o dos grupos 3 e 9 meses foram 9,2% e 6,50% menor do que seus controles, respectivamente (figura 14).

O volume ósseo das vértebras dos animais controles aumentou gradualmente até os 6 meses, quando estabilizou. Com os animais intoxicados ocorreu um platô entre 3-9 meses, a partir daí aumentando até 12 meses. O volume ósseo dos fêmures dos animais intoxicados foi 14,41 % maior no grupo 3 meses comparado ao seu respectivo controle (figura 15).

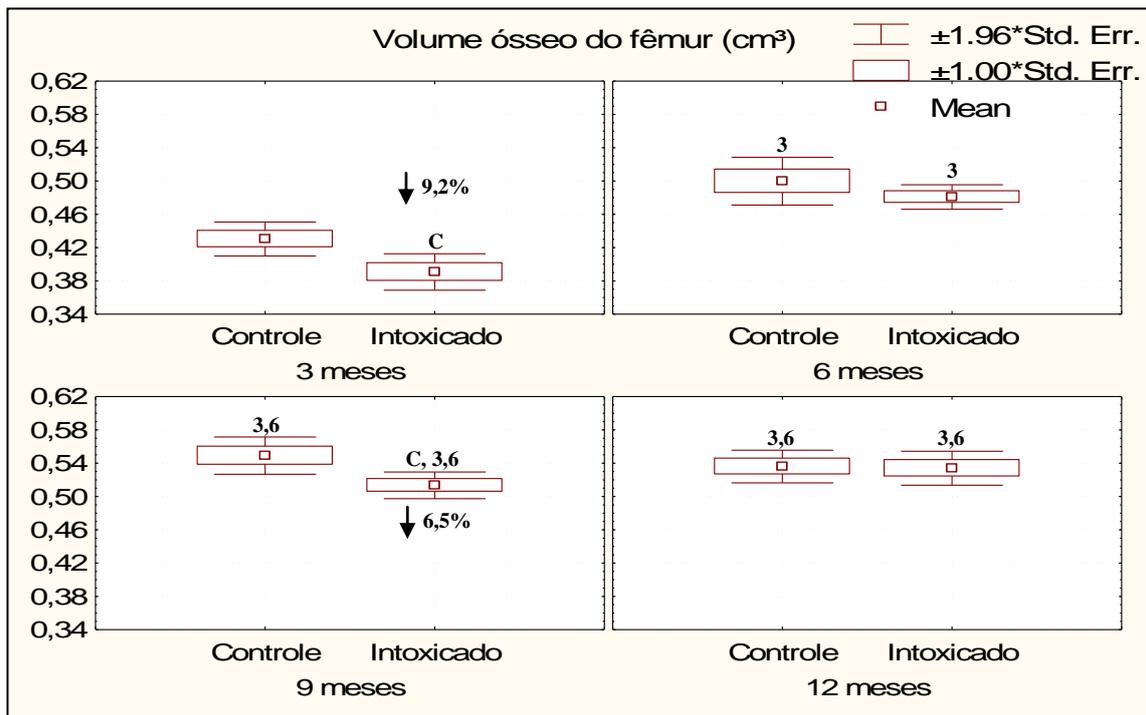


Figura 14. Média \pm EPM do volume ósseo dos fêmures das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

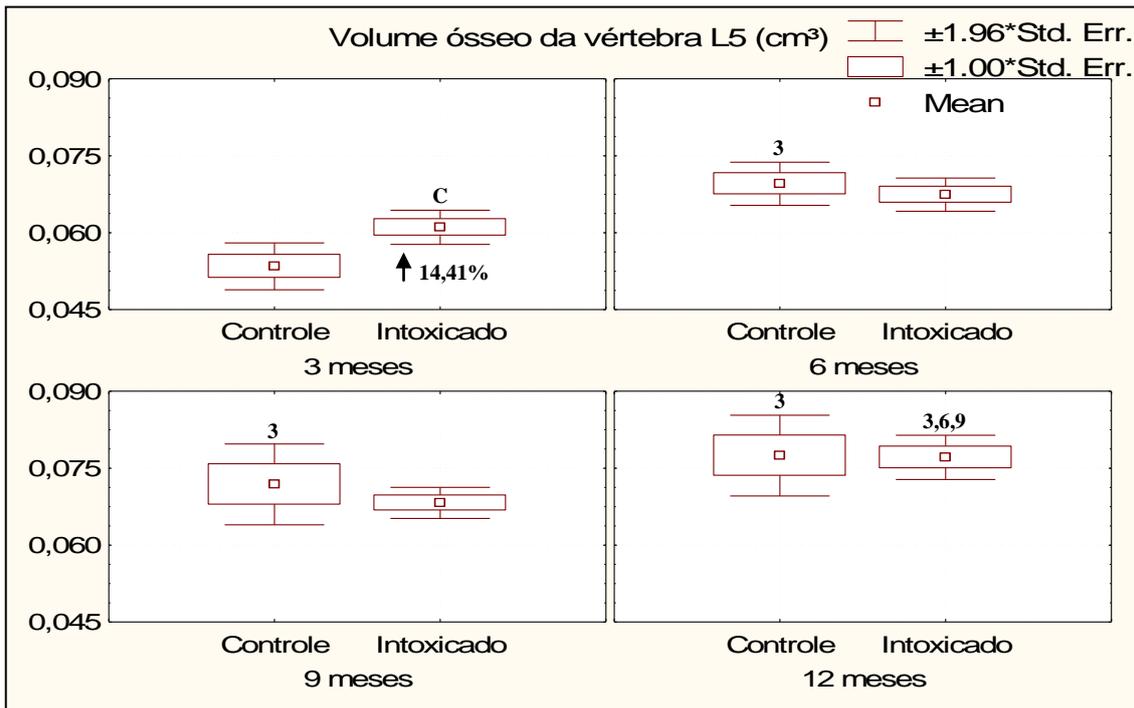


Figura 15. Média \pm EPM do volume ósseo das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 3 meses, ⁹ p < 0,05 vs 3 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

4.4.4 Peso das cinzas (g)

O peso das cinzas dos fêmures dos animais controles aumentou gradualmente com a idade, estabilizando aos 9 meses. Nos animais intoxicados, este parâmetro aumentou até os 6 meses, ocorrendo um platô entre 6-9 meses, aumentando a partir daí.

Este parâmetro nos animais intoxicados do grupo 12 meses foi 11,70% e 9,59% maior do que o dos grupos 6 e 9 meses, respectivamente. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, o grupo 9 meses reduziu o peso das cinzas em 11,74% (figura 16).

Nas vértebras, o efeito da idade neste parâmetro nos animais controles e intoxicados mostrou um aumento até os 6 meses, estabilizando a partir daí. Nenhum efeito da intoxicação foi observado (figura 17).

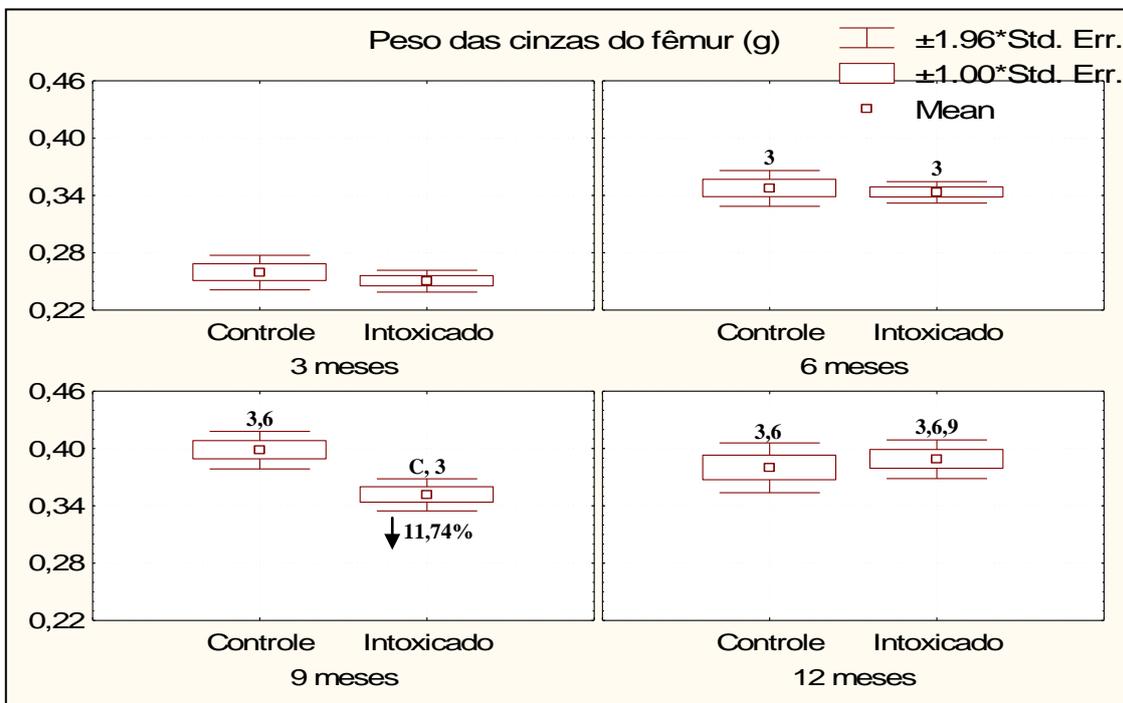


Figura 16. Média \pm EPM do peso das cinzas dos fêmures das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

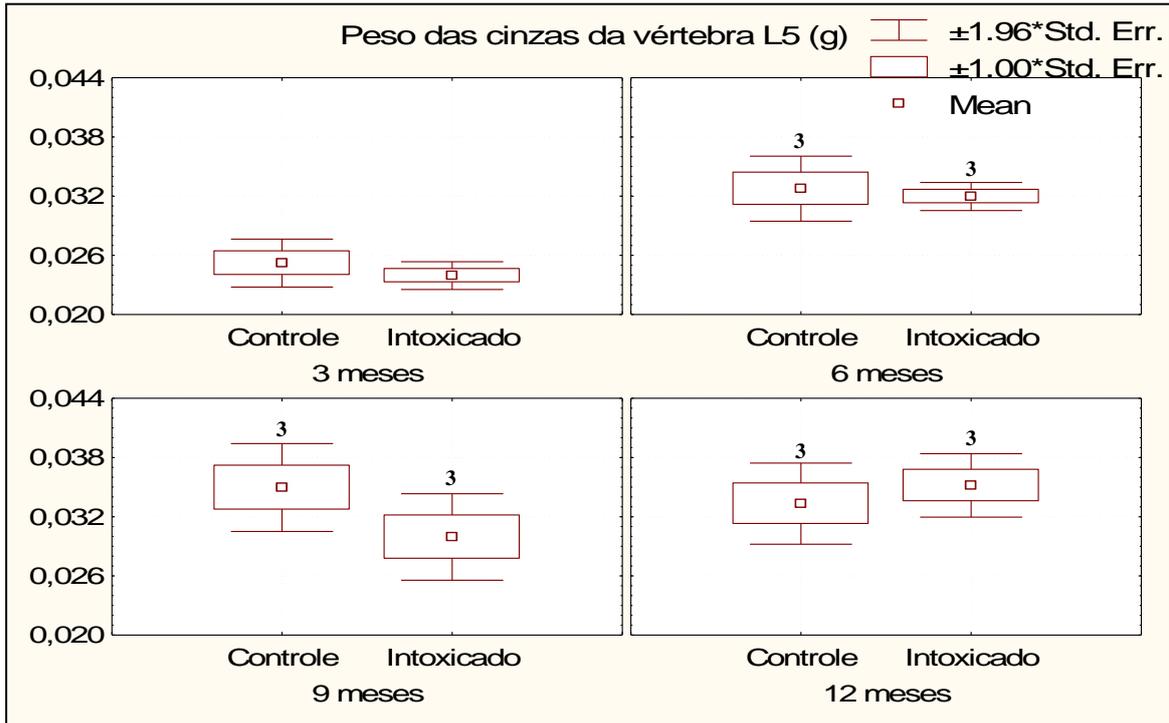


Figura 17. Média \pm EPM do peso das cinzas das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ³ p < 0,05 vs 3 meses.

4.4.5 Densidade óssea (g/cm³)

A densidade óssea dos fêmures dos animais controles aumentou até os 6 meses, ocorrendo um platô entre 6-9 meses, reduzindo a partir desta idade. O efeito da idade nos animais intoxicados mostrou um platô entre os 3-6 meses, reduzindo aos 9 meses, quando estabilizou. Ainda em relação ao fêmur, os animais intoxicados dos grupos 9 e 12 meses foi 3,41% e 3,14% menor do que a do grupo 6 meses, respectivamente (figura 18).

Com relação às vértebras, a do grupo 6 meses foi 3,86% maior que a do grupo 3 meses. Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, nos fêmures, a do grupo 3 meses foi 4,69% maior e nas vértebras, foi 4,35% menor (figura 19).

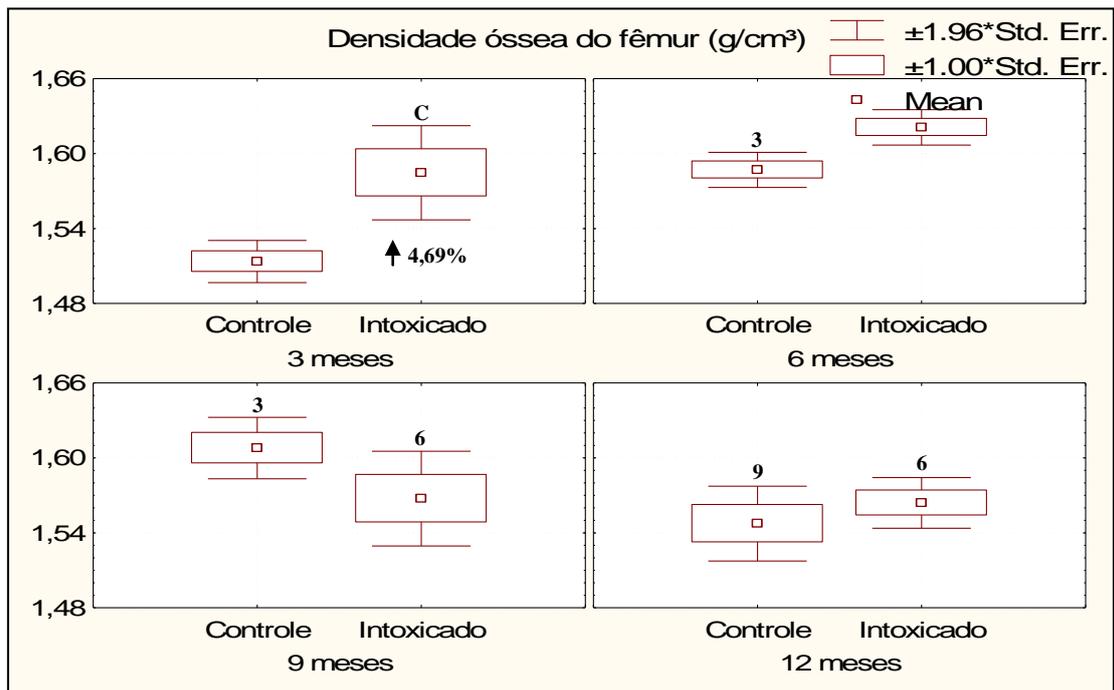


Figura 18. Média \pm EPM da densidade óssea dos fêmures das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

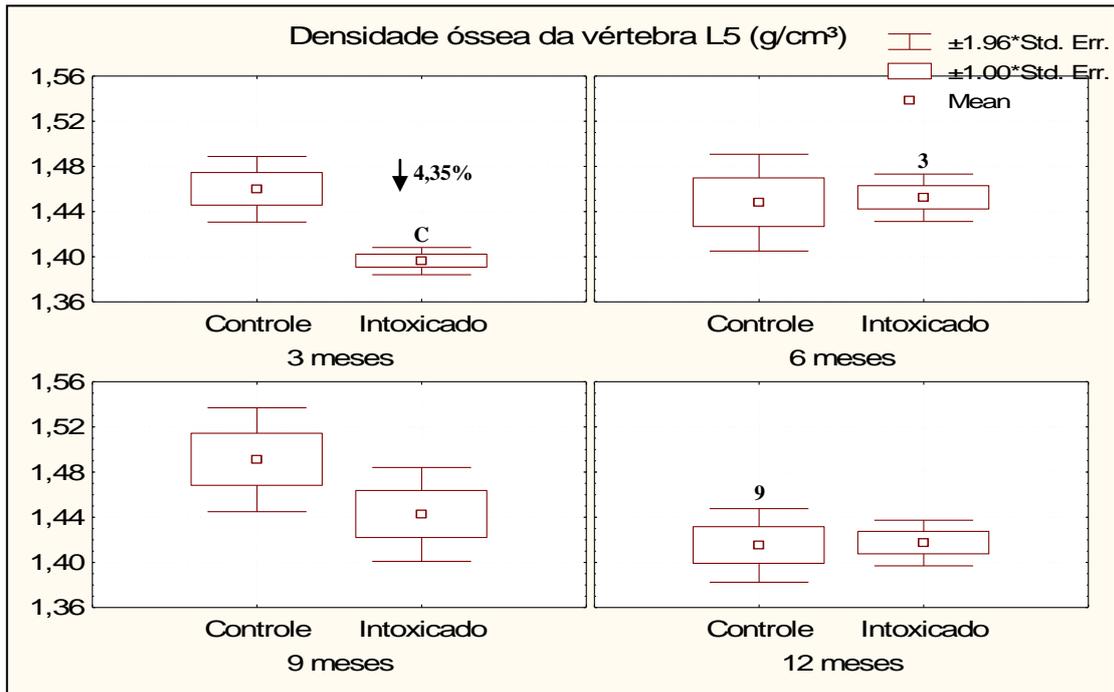


Figura 19. Média \pm EPM da densidade óssea das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

4.4.6 Densidade mineral (g/cm³)

Nos fêmures dos animais controles e intoxicados, a densidade mineral aumentou gradualmente até os 6 meses, quando estabilizou e as vértebras não apresentaram tal efeito (figuras 20, 21).

Nas vértebras dos animais intoxicados, a densidade mineral do grupo 6 meses foi 17,31% maior que a do grupo 3 meses (figura 21). Comparando os animais intoxicados com seus respectivos controles, nos fêmures, a densidade mineral do grupo 3 meses foi 6,76% maior e nas vértebras 17,17% menor (figuras 20, 21, respectivamente).

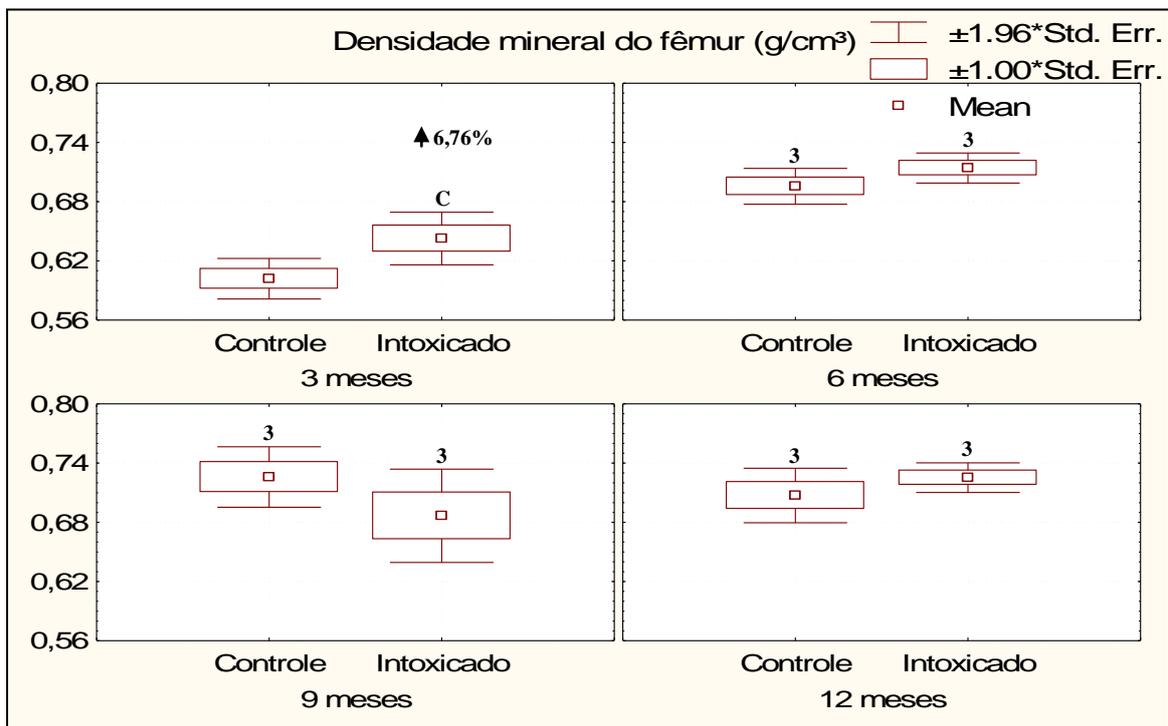


Figura 20. Média \pm EPM da densidade mineral dos fêmures das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de aumento em relação aos respectivos controles.

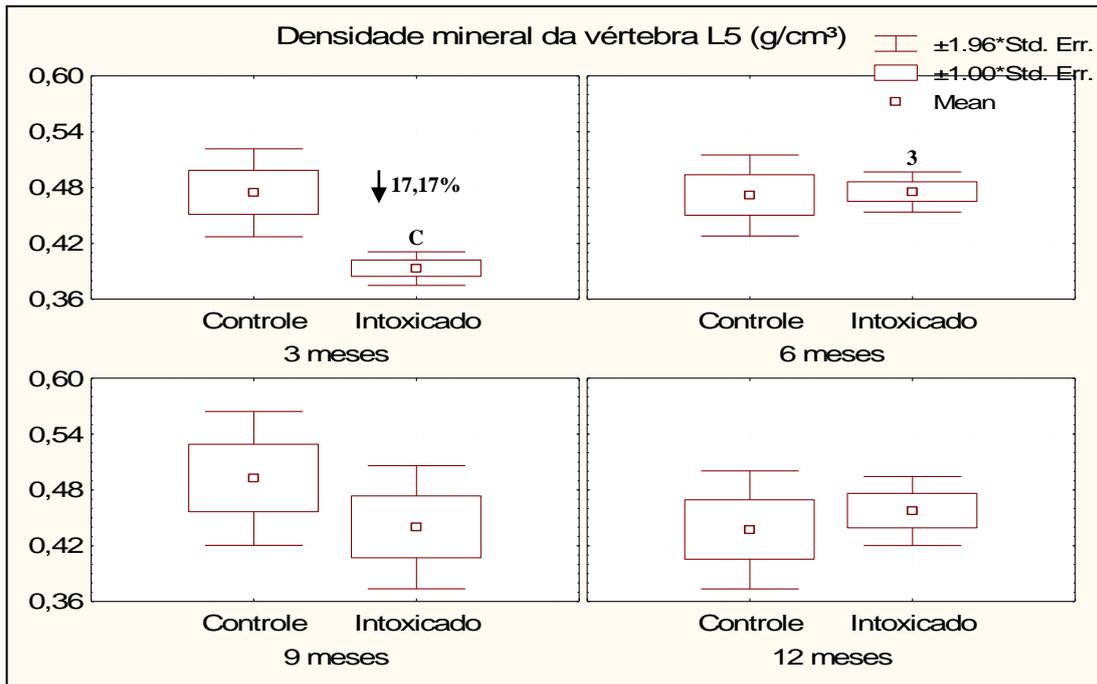


Figura 21. Média \pm EPM da densidade mineral das vértebras das ratas dos diferentes grupos experimentais. N=7-10; ^C $p < 0,05$ vs respectivo controle, ³ $p < 0,05$ vs 3 meses. Valores numéricos indicam a porcentagem de redução em relação aos respectivos controles.

4.5 Correlações biomecânicas X biométricas e biofísicas

Correlações significantes foram observadas entre as propriedades biomecânicas dos fêmures e seus comprimentos (comp), peso de material orgânico (PMO), peso das cinzas (Pcinzas), volume ósseo (VO), densidade óssea (DO) e densidade mineral (DM) (tabela 4).

Nas vértebras, também foram observadas correlações significantes entre as variáveis descritas pelas propriedades biomecânicas e suas alturas (Alt), peso de material orgânico

(PMO), peso das cinzas (Pcinzas), volume ósseo (VO), densidade óssea (DO) e densidade mineral (DM) (tabela 5).

Tabela 4. Correlação entre as propriedades biomecânicas dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais e seus comprimentos (Comp), peso de material orgânico (PMO), peso das cinzas (Pcinzas), volume ósseo (VO), densidade óssea (DO) e densidade mineral (DM).

Parâmetros	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Resiliência (J)
Comp (mm)	0,7893*	0,7731*	0,2038
PMO (g)	0,7106*	0,7126*	0,1963
Pcinzas (g)	0,8166*	0,8002*	0,2414
VO (cm ³)	0,7874*	0,7871*	0,2213
DO (g/cm ³)	0,1395	0,1064	0,0840
DM (g/cm ³)	0,6127*	0,5626*	0,2111

Média ± EPM, n=7-10; * p < 0,05.

Tabela 5. Correlação entre as propriedades biomecânicas das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais e suas alturas, peso de material orgânico (PMO), peso das cinzas (Pcinzas), volume ósseo (VO), densidade óssea (DO) e densidade mineral (DM).

Parâmetros	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Resiliência (J)
Altura (mm)	0,3061*	0,2278	0,1817
PMO (g)	0,4692*	0,4172*	0,3284*
Pcinzas (g)	0,4764*	0,2696*	0,3224*
VO (cm ³)	0,3670*	0,2589*	0,3859*
DO (g/cm ³)	0,5569*	0,4125*	0,1512
DM (g/cm ³)	0,2704*	0,1127	0,0558

Média ± EPM, n=7-10; * p < 0,05.

5. DISCUSSÕES

Na literatura encontra-se bem estabelecida a teoria de que o chumbo é capaz de incorporar-se ao tecido ósseo substituindo o cálcio no cristal de hidroxiapatita, formando piromorfita (ARNICH et al., 2003). Neste estudo, com análises químicas de espectrometria de absorção atômica foi verificado que o chumbo foi incorporado ao tecido ósseo dos animais intoxicados e nada foi detectado na tíbia do animal controle (tabela 1). Observa-se alta concentração de chumbo no osso dos animais com 3 meses, aumentando com 6 meses e reduzindo com 9 e 12 meses. Possivelmente esteja ocorrendo uma mobilização do chumbo da corrente sanguínea (aos 3 meses) e tecidos moles (aos 6 meses) para o tecido ósseo, e o inverso ocorrendo nas idades subseqüentes. Leggett (1993), propôs um modelo mostrando a mobilização constante do chumbo do compartimento sanguíneo para o tecido ósseo e vice-versa. Este modelo foi testado por Nie et al. (2005), que confirmaram esta hipótese em humanos. Nossos dados corroboram os resultados de Han et al. (1997), que verificaram que a concentração de chumbo diminuía em fêmur de ratas Sprague-Dawley, após a administração de 250mg/l de acetato de chumbo em água de beber, durante 5 semanas, apesar da metodologia ser diferente da utilizada no presente trabalho. Jurkiewicz et al. (2005), na Polônia, verificaram que a concentração de chumbo aumentava com o avanço da idade em humanos. Isto pode ter ocorrido pelo fato dessas pessoas estarem sendo expostas continuamente ao chumbo ambiental.

A massa corporal dos animais é uma variável importante, pois exerce estresse mecânico sobre os ossos contribuindo para o ganho de massa óssea (BURR; ROBLING; TURNER, 2002). No presente estudo, não houve diferença de massa corporal inicial e final dos animais de todos os grupos experimentais em relação aos seus controles (tabela 2). Esta

homogeneidade possibilitou a padronização necessária, o controle dos ensaios propostos e demonstrou que não houve alteração do desenvolvimento somático dos animais. São encontrados na literatura dados conflitantes de ganho de massa corporal de animais expostos ao chumbo. Ronis et al. (1996), intoxicaram ratas pré-puberes e adultas jovens com acetato de chumbo em água de beber 0,6% por 61 dias e não observaram diferença da massa corporal final dos animais adultos jovens. Porém, as ratas pré-puberes apresentaram uma diminuição da massa corporal final mostrando a influência negativa deste metal em seu desenvolvimento corporal. González-Riola et al. (1997), verificaram aumento da massa corporal final de ratas que receberam uma dieta enriquecida com chumbo, durante 50 dias. Bagchi e Preuss (2005), não observaram diferença do peso corporal final de ratas Sprague-Dawley tratadas com acetato de chumbo a 1% em água de beber, durante 40 dias. Os dados conflitantes podem estar refletindo as diferentes condições experimentais.

Neste estudo, observa-se o crescimento dos fêmures e das vértebras dos animais controles e intoxicados com a idade. No entanto, no grupo intoxicado 9 meses percebe-se um retardo do crescimento dos fêmures (tabela 3). Gonzalez-Riola et al. (1997), não observaram diferença do comprimento do fêmur de animais que receberam dieta enriquecida com chumbo. Escribano et al. (1997), não verificaram diferença do comprimento do fêmur de ratas intoxicadas com dieta enriquecida com chumbo, mas obtiveram um aumento da altura da 5ª vértebra lombar dos animais intoxicados em relação aos seus controles. Ronis, Aronson e Gao (2001), não observaram diferença do comprimento da tíbia de ratas tratadas com 2475 ppm de acetato de chumbo em água de beber. Alguns autores relatam um importante efeito regulatório do chumbo sobre o platô de crescimento em culturas de condrócitos e sugerem um efeito inibitório sobre o processo de formação óssea endocondral (HICKS et al. 1996). Em humanos, Ignasiak et al. (2006), relataram que meninas entre 7-15 anos de idade com níveis altos de Pb sanguíneo apresentaram 2,9 cm de redução do comprimento da perna, sendo

assim, eles concluíram que o crescimento esquelético linear foi reduzido com o aumento de níveis sanguíneos de Pb.

Os parâmetros biomecânicos (força máxima, rigidez e resiliência) são medidas quantitativas que refletem a qualidade óssea. As propriedades mecânicas do osso dependem da disposição da microarquitetura óssea e de suas propriedades materiais (peso úmido, peso de material orgânico, volume ósseo, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral). O risco de fraturas depende da qualidade óssea e/ou das propriedades materiais do osso.

A análise dos resultados dos testes biomecânicos dos ossos dos animais controles ao longo dos 12 (doze) meses de período experimental revelaram o aumento gradativo dos valores das propriedades mecânicas com a maturidade óssea, mostrando um platô entre 9 e 12 meses (figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9). Segundo Zioupos (2001), as propriedades biomecânicas mudam com a idade. Ossos jovens, por terem sua mineralização incompleta, são mais elásticos. Durante o crescimento, o osso vai se mineralizando e perdendo sua elasticidade com o avanço da idade.

Neste estudo, ao observarmos os efeitos do chumbo sobre a qualidade óssea verificamos que este metal pesado diminuiu a resistência do osso dos animais ao longo da vida, não mostrando ser tempo-dependente (figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9). Os resultados dos testes biomecânicos claramente revelaram que ratas expostas ao chumbo nos estágios iniciais de crescimento e desenvolvimento ósseo tiveram um enfraquecimento das propriedades biomecânicas com o avanço da idade, podendo ser observado tanto em ossos constituídos predominantemente por osso cortical (fêmures), bem como, nos constituídos predominantemente por osso trabecular (vértebras). Nos fêmures, esta redução da qualidade óssea pôde ser observada em três estágios de maturidade esquelética (6, 9 e 12 meses) (figuras 4, 6, 8), já nas vértebras, esta diminuição refletiu-se apenas em ratas com maturidade esquelética consolidada (9 meses) (figuras 5, 7, 9). Com base nestes resultados concluímos

que a exposição ao chumbo tem gerado fortes efeitos adversos sobre a resistência óssea. Outros autores não observaram diferença da força máxima obtida em ensaios biomecânicos com tibia de ratas tratadas com 2475 ppm de acetato de chumbo em água de beber (RONIS; ARONSON; GAO, 2001).

Os efeitos do chumbo sobre as propriedades biomecânicas de tecidos ósseos são pouco estudados na literatura, enquanto os efeitos do cádmio foram mais explorados. O Cádmio, assim como o chumbo, é um metal bivalente que se incorpora ao tecido ósseo provocando injúrias (GOYER, 1997). Nossos resultados são semelhantes aos de um grupo de autores que analisaram os efeitos do cádmio sobre o tecido ósseo e observaram que ratas expostas a baixos níveis deste metal ao longo da vida apresentaram uma redução da força máxima obtida no teste biomecânico realizado na diáfise femural dos animais com 9 e 12 meses de idade (BRZÒSKA; MAJEWSKA; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2005a). Este mesmo grupo de autores, também observaram redução da força máxima em ensaios biomecânicos com tibias de ratas com 12 meses de idade expostas a 1, 5 e 50 mg de cádmio/ litro de água (BRZÒSKA; MAJEWSKA; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2005b). Sendo assim, podemos dizer que os metais pesados (chumbo e cádmio) são capazes de reduzir a resistência biomecânica de tecidos ósseos de ratas com maturidade esquelética, principalmente no 9º mês de vida.

A diminuição dos valores das propriedades biomecânicas observadas neste trabalho refletiram em desordens que ocorreram durante a mineralização óssea dos animais, fato observado com a redução de alguns parâmetros ósseos (nos fêmures – comprimento, pesos úmido, de material orgânico, volume ósseo e peso das cinzas) em relação aos seus controles, mostrando uma influência negativa da exposição ao chumbo sobre o desenvolvimento esquelético destes animais (tabela 3 e figuras 10, 12, 14, 16, respectivamente). O comprimento reduzido dos fêmures levou a uma redução do volume ósseo, que por sua vez refletiu sobre a redução dos pesos (pesos úmido, de material orgânico e das cinzas) (tabela 3 e

figuras 14, 10, 12, 16, respectivamente), provocando a redução dos parâmetros biomecânicos (força máxima, rigidez e resiliência do fêmur direito) (figuras 4, 6 e 8, respectivamente). As correlações positivas descritas entre os parâmetros biomecânicos x biométricos e biofísicos dos fêmures confirmam estas considerações (tabela 4). A redução do volume ósseo dos fêmures levou a um aumento das densidades óssea e mineral apenas dos animais intoxicados com 3 meses em relação aos seus controles (figuras 14, 18, 20, respectivamente). As vértebras, deste mesmo grupo de animais, apresentaram maior altura vertebral em relação ao seu controle, aumentando assim o volume ósseo, induzindo uma diminuição das densidades ósseas e minerais (tabela 3 e figuras 15, 19, 21, respectivamente), isto deve ter ocorrido por motivos anatômicos, ou seja, mais pela variação biológica dos animais do que pelo efeito do chumbo. Os prejuízos dos tecidos ósseos induzidos pelo chumbo podem ser avaliados pelas reduções dos parâmetros estudados. Nas vértebras, estas reduções ocorreram predominantemente nas propriedades biomecânicas, principalmente em ossos maduros (9 meses) (figuras 5, 7, 9). Além disso, ao verificarmos a correlação entre os parâmetros biomecânicos das vértebras e suas alturas, peso de material orgânico, volume ósseo, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral observamos que principalmente a força máxima descreveu uma correlação positiva significativa com todos estes parâmetros mostrando que a redução da resistência das vértebras dos animais foi positivamente influenciada pelos parâmetros biométricos e biofísicos avaliados (tabela 5). Cabe aqui ressaltar que a redução dos parâmetros biomecânicos não depende somente de reduções nas propriedades físicas, mas também, do arranjo estrutural da microarquitetura óssea após a incorporação do metal. A literatura apresenta autores correlacionando tais parâmetros em estudos com animais e humanos. Em animais, Escribano et al. (1997), observaram aumento da densidade óssea dos fêmures e das vértebras de ratas expostas ao chumbo em relação aos seus controles. Bagchi e Preuss (2005), obtiveram redução da densidade óssea dos fêmures de ratas Sprague-Dawley

tratadas com acetato de chumbo a 1% em água de beber. Em humanos, Sun et al. (2008), verificaram redução da densidade óssea do rádio e da ulna de mulheres com mais de 40 anos de idade, expostas ao chumbo ambiental. Vários autores na literatura observaram redução da densidade óssea (MACHIDA et al., 2009; POPOVIC et al., 2005; POTULA; KLEINBAUM; KAYE, 2006). Khalil et al. (2008), observaram aumento da densidade óssea do colo femoral de mulheres com baixos níveis de chumbo no sangue. Theppeang et al. (2008), encontraram aumento da densidade óssea associada a níveis altos de chumbo na tíbia de mulheres entre 50-70 anos de idade. Portanto, existem resultados controversos na literatura tanto em pesquisas com animais quanto com humanos em relação à densidade óssea em resposta à intoxicação com chumbo.

Outros autores relatam a toxicidade do chumbo em células ósseas através da indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). O chumbo possui alta afinidade com os grupos sulfídricos (SH) (GRAZIANO, 1994). A ligação de metais pesados com estes grupos (SH) estimula a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido de oxigênio ($O^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}), induzindo aumento da peroxidação lipídica que induz danos ao DNA, alteração da homeostase do cálcio e inibição da divisão celular (EL-ASHMAWY et al., 2006; YU; LIN; LIN-TAN, 2004). Alguns autores mostram que altos níveis de H_2O_2 aumentam a diferenciação de osteoclastos e diminuem a diferenciação de osteoblastos, provocando uma acentuada diminuição da densidade óssea (MACHIDA et al., 2009; NAM et al., 2002). Portanto, acreditamos que a intoxicação com chumbo pode prejudicar a atividade de diversos grupos celulares, inclusive das células ósseas, comprometendo a mineralização óssea e influenciando negativamente a qualidade óssea com a redução dos parâmetros biomecânicos (força máxima, rigidez e resiliência dos fêmures e das vértebras) principalmente em ossos maduros.

Em função da escassez de dados na literatura em relação aos efeitos do chumbo sobre o tecido ósseo de ratos, tornam-se relevantes os resultados biomecânicos obtidos no presente estudo demonstrando a redução da resistência do tecido ósseo e aumentando sua predisposição à fraturas.

6. CONCLUSÕES

- O chumbo não prejudicou o crescimento ponderal dos animais experimentais.
- O chumbo foi capaz de se incorporar ao tecido ósseo dos animais intoxicados.
- O chumbo comprometeu os parâmetros físicos reduzindo a biomecânica de ossos corticais e trabeculares de animais com maturidade esquelética, não sendo tempo-dependente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTER, M. P.; WELLS, D. J.; SHORT, S. J.; CULLEN, D. M.; JOHNSON, M. L.; HAYNATZKI, G. R.; BABIJ, P.; ALLEN, K. M.; YAWORSKY, P. J.; BEX, F.; RECKER, R. R. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. *Bone*, v.35, p.162-169, 2004.

ALEXANDER, B. H. Interaction of blood lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. *Environ. Health Perspect.* , v.106, p. 213-216, 1998.

AL-MODHEFER, A. J. A.; BRADBURY, M. W. B.; SIMMONS, T. J. B. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clin. Sci.*, v. 81, p.823-829, 1991.

ARAKI, S.; SATA, F.; KATSUYUKI, M. Adjustment for urinary flow rate and improvement approach for biological monitoring. *Int. Arch. Environ. Health*, v.62, p.471-477, 1990.

ARNICH, N.; LANHERS, M. C.; LAURENSOT, F.; PODOR, R.; MONTIEL, A.; BURNEL, D. In vitro and in vivo studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite. *Environ. Pollut.*, v.124, p.139-149, 2003.

ATSDR . *Toxicological profile for lead*. Atlanta, Geórgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, p.19-31, 2007.

BAGCHI, D.; PREUSS, H. G. Effects of acute and chronic oral exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats. *J. Inorg. Biochem.*, v.99, p.1155-1164, 2005.

BARRY, P. S. I. A comparison of concentration of lead in human tissues. *Brit. J. Industrial Medicine* v.32, p.119-139, 1975.

BELINGER, D. C.; LEVITON, A.; WATUNAUX, C. Longitudinal analyses of prenatal lead exposure and early cognitive development. *N. Engl. J. Med.*, v.316, p.1037-1043, 1987.

BRZÒSKA, M. M.; MAJEWSKA, K.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Bone mineral density, chemical composition and Biomechanical properties of the tibia of female rats exposed to cadmium since weaning up to skeletal maturity. *Food Chem. Toxicol.*, v.43, p.1507-1519, 2005a.

BRZÒSKA, M. M.; MAJEWSKA, K.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Weakness in the mechanical properties of the femur of growing female rats exposed to cadmium. *Arch. Toxicol.*, v.79, p.277-288, 2005b.

BURR, D. B.; ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone*, v.30, p.781-786, 2002.

CANDELA, S.; FERRI, F.; OLMI, M. Lead exposure in the ceramic tile industry: time trends and current exposure level. *Ann. Inst. Super Sanita*, v.34, p. 137-43, 1998.

ÇELİK, A.; ÖGENLER, O.; ÇOMELEKOĞLU, Ü. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. *Mutagenesis*, v.20, p.411- 415, 2005.

EL-ASHMAWY, I. M.; ASHRY, K. M.; EL-NAHAS, A. F.; SALAMA, O. M. Protection by turmeric and myrrh against liver oxidative damage and genotoxicity induced by lead acetate in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.98, p.23-27, 2006.

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.

ESCRIBANO, A.; REVILLA, M.; HERNÁNDEZ, E. R.; SECO, C.; GONZÁLEZ-RIOLA, J.; VILLA, L. F.; RICO, H. Effect of lead on bone development and bone mass: a morphometric, densitometric, and histomorphometric study in growing rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.60, p.200-203, 1997.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I.; GRACIA, M. A. A.; PINGARRÓN, M. D. C.; JEREZ, L. B. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med. Oral.*, v.11, p.47-51, 2006a.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I.; GRACIA, M. A. A.; PINGARRÓN, M. D. C.; JEREZ, L. B. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med. Oral.*, v.11, p.51-57, 2006b.

FOWLER, B. A. Biological roles of high affinity metal-binding proteins in mediating cells injury. *Comments Toxicol.*, v.3, p.27-46, 1989.

FREITAS, C. U.; De CAPITANI, E. M.; GOUVEIA, N.; SIMONETTI, M. H.; SILVA, M. R. P.; KIRA, C. S.; SAKUMA, A. M.; CARVALHO, M. F. H.; DURAN, M. C.; TIGLEA, P.; ABREU, M. H. Lead exposure in an urban community: Investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. *Environ. Res.*, v.103, p.338-344, 2007.

FROST, H. M.; JEE, W. S. S. On the Rat Model of Human Osteopenias and Osteoporosis. *Bone Min.*, v.18, p.227-236, 1992.

GRAZIANO, J. H. Validity of lead exposure markers in diagnosis and surveillance. *Clin. Chem.*, v.40, p.1387-1390, 1994.

GOLDSBERG, M.; LEVIN, S. M.; DOUCETTE, J. T.; GRIFFIN, G. A task-based approach to assessing lead exposure among iron workers engaged in bridge rehabilitation. *Am. J. Ind. Medicine*, v.31, p.310-318, 1997.

GONZALEZ-RIOLA, J.; HERNANDEZ, E. R.; ESCRIBANO, A.; REVILLA, M.; CASECO; VILLA, L. F.; RICO, H. Effect of lead on bone and cartilage in sexually mature rats: a morphometric and histomorphometry study. *Environ. Res.*, V.74, P.91-93, 1997.

GOYER, R. A. Toxic and essential metal interactions. *Ann. Rev. Nutr.*, v. 17, p.37-50, 1997.

HAMILTON, J.D.; O'FLAHERTY, E. J. Influence of lead on mineralization during bone growth. *Fund. Appl. Toxicol.*, v.26, p.265-271, 1995.

HAN, S.; QIAN, X.; KEMP, F. W.; BOGDEN, J. D. Lead exposure at an early age substantially increases lead retention in the rat. *Environ. Health Perspect.*, v.105, p.412-417, 1997.

HICKS, D. G.; O'KEEFE, R. J.; REYNOLDS, K. J.; CORY-SLECHTA, D. A.; PUZAS, J. E.; JUDKINS, A.; ROSIER, R. N. Effects of lead on growth plate chondrocyte phenotype. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.140, p.164-172, 1996.

HIPKINS, K. L.; MATERNA, B.; KOSNETT, M. J.; ROGGE, J. W.; CONE, J. E. Medical surveillance of the lead exposure worker. *AAOHN J.*, v.46, p.330-339, 1998.

IGNASIAK, Z.; SLAWINSKA, T.; ROZEK, K.; LITTLE, B. B.; MALINA, R. M. Lead and growth status of schoolchildren living in the copper basin of south-western Poland: differential effects on bone growth. *Ann. Human Biol.*, v.33, p.401-414, 2006.

IZMEROV, N. F. Assessment of effects of lead on human. *Med. Tr. Prom. Ekol.*, v.12, p.1-4, 1998.

JURKIEWICZ, A.; WIECHULA, D.; NOWAK, R.; LOSK, A K. Lead content in the femoral heads of inhabitants of Silesia (Poland). *J. Trace Elem. Med. Biol.*, v.19, p.165-170, 2005.

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

KEENAN, M. J. H.; JONES, K. J.; DELANY, J. P.; KIME, J.C.; MELANCON, L. E.; TULLEY, R. T.; HONG, K. D. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle. *J. Bone Min. Res.*, v.12, p.1903-1907, 1997.

KELADA, S. N.; SHELTON, E.; KAUFMANN-KHOURY, M. J. Human genome epidemiology (HuGE) reviews. δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, v. 154, p. 1-13, 2001.

KHALIL, N.; CAULEY, J. A.; WILSON, J. W.; TALBOTT, E. O.; MORROW, L.; HOCHBERG, M. C.; HILLIER, T. A.; MULDOON, S. B.; CUMMINGS S. R. Relationship of blood lead levels to incident nonspine fractures and falls in older women: the study of osteoporotic fractures. *J. Bone Min. Res.* v.23, p.1417-1425, 2008.

LATORRE, F. G.; HERNÁNDEZ-AVILA, M.; OROZCO, J. T. Relationship of blood and bone lead to menopause and bone mineral density among middle-age women in Mexico City. *Environ. Health Perspect.*, v.11, p.631-636, 2003.

LEGGETT, R. W. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ. Health Perspect.*, v.101, p.598-616, 1993.

LIPPMAN, M. Lead and human health: Background and recent findings. *Environ. Res.*, v.51, p.1-24, 1990.

MACHIDA, M.; SUN, S. J.; OGUMA, E.; KAYAMA, F. High bone matrix turnover predicts blood levels of lead among perimenopausal women. *Environ. Res.* doi:10.1016/j.envres.2009.06.005, 2009.

MESTEK, O.; DEYL, Z.; MIKSIK, I. Accumulation of lead in tissues after its administration in drinking water to laboratory rats. *Physiol. Res.*, v.47, p.197-202, 1998.

MILLER, P. D. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v.7, n.1-2, Jun, p.75-89. 2006.

NAM, S. H.; JUNG, S. Y.; YOO, C. M.; AHN, E. H.; SUH, C. K. H₂O₂ enhances Ca²⁺ release from osteoblast internal stores. *Yonsei Med. J.*, v.43, p.229-235, 2002.

NIE, H.; CHETTLE, D. R.; WEBBER, C. E.; BRITO, J. A. A.; O'MEARA, J. M.; MCNEILL, F. E. The study of age influence on human bone lead metabolism by using a simplified model and X-ray fluorescence data. *J. Environ. Monit.*, v.7, p.1069-1073, 2005.

ONG, C. N.; CHIA, S. E.; FOO, S. C. Concentrations of heavy metals in maternal and umbilical cord. *Blood Bio Metals*, v.6, p.61-66, 1993.

PAOLIELO, M. M. B; De CAPITANI, E. M. Ocupacional and environmental human lead exposure in Brazil. *Envirom. Res.*, v.103, p.288-297, 2007.

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

POPOVIC, M.; MCNEILL, F. E.; CHETTLE, D. R.; WEBBER, C. E.; LEE, C. V.; KAYNE, W. E. Impact of occupational exposure on lead levels in women. *Environ. Health Perspect.*, v.113, p.478-484, 2005.

POTULA, V.; KLEINBAUM, D.; KAYE, W. Lead exposure and spine bone mineral density. *J. Occup. Environ. Med.*, v.48, p.556-564, 2006.

POUNDS, J.G.; LONG, G. J.; ROSEN, J. F. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ. Health Perspect.*, v.91, p.17-32, 1991.

RABINOWITZ, M. B. Toxicokinetics of bone lead. *Environ. Health Perspect.*, v.91, p.33-7, 1991.

RIGGS, B. L.; MELTON, L. J.; ROBB, R. A.; CAMP, J. J.; ATKINSON, E. J.; OBERG, A. L.; ROULEAU, P. A.; MCCOLLOUGH, C. H.; KHOSLA, S.; BOUXSEIN, M. L. Population-based analysis of the relationship of whole bone strength indices and fall-related loads to age- and sex-specific patterns of hip and wrist fractures. *J. Bone Miner. Res.*, v.21, p.315-323, 2006.

RONIS, M. J.; ARONSON, J.; GAO, G. G. (2001) Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. *Toxicol. Sci.*, v.62, p.321-329, 2001.

RONIS, M. J.; BADGER, T. M.; SHEMA, S. J.; ROBERSON, P. K.; SHAIKH, F. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicol. Applied. Pharm.*, v.136, p.361-371, 1996.

SHEETS, R. W. Release of heavy metals from european and asian porcelain dinnerware. *Sci.Total. Environ.* v.212, p. 107-113, 1998.

SIMONS, T. J. B. lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. *Pfugers Arch.*, v.423, p.307-313, 1993.

SKERFVING, S.; NILSSON, U.; SCHUTZ, A.; GERHARDSSON, L. Biological monitoring of inorganic lead. *Scand. J. Work Environ. Health*, v.19, p. 59-64, 1993.

SMITH, C. M.; WANG, X.; HU, H.; KELSEY, K. T. A polymorphism in the δ -aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ. Health Perspect.*, v.103, p.248-253, 1995.

SMITH Jr., D. M.; MIELKE, H. W.; HENEGHAN, J. B. Subchronic lead feeding study in male rats and micropigs. *Environ. Toxicol.*, v.24, p.453-461, 2009.

SUN, Y.; SUN, D.; ZHOU, Z.; ZHU, G.; ZHANG, H.; CHANG, X.; LEI, L.; JIN, T. Osteoporosis in a Chinese population due to occupational exposure to lead. *Am. J. Ind. Med.*, v.51, p.436-442, 2008.

THEPPEANG, K.; GLASS, T. A.; BANDEEN-ROCHE, K.; TODD, A. C.; ROHDE, C. A.; LINKS, J. M.; SCHWARTZ, B. S. Associations of bone mineral density and lead levels in blood, tibia, and patella in urban-dwelling women. *Environ. Health Perspect.*, v.116, p.784-790, 2008.

TONG, S.; SCHIRNDING, Y. E.; PRAPAMONTOL, T. **Bulletin of the World Health Organization**. v.78, p.1068-1077, 2000.

UNGVÁRY, G.H. Haemodynamic effects of lead(II) acetate, ethanol, and their combination in rats. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, v.75, p.45-53, 2002.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M. T. D. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, v.39, p.44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, v.160, p.1-40, 2006.

YU, C. C.; LIN, J. L.; LIN-TAN, D. T. Environmental exposure to lead and progression of chronic renal diseases: a four-year prospective longitudinal study. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.15, p.1016-1022, 2004.

ZIOUPOS P. Accumulation of in-vivo fatigue microdamage and its relation to biomechanical properties in ageing human cortical bone. *J. Microsc.*, v.201, p.270-278, 2001.

APÊNDICE

Apêndice A – Tabela da Força máxima (N), Rigidez (N/mm) e Resiliência (J) do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos em teste biomecânico.

Parâmetros/ Grupos	Tratamento	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Resiliência (J)
3 meses	C	76,54 ± 4,70	139,24 ± 8,96	0,0361 ± 0,0030
	I	78,85 ± 2,97	138,80 ± 9,11	0,0407 ± 0,0027
6 meses	C	105,20 ± 3,19 ³	209,13 ± 10,69 ³	0,0393 ± 0,0025
	I	93,13 ± 2,31 ^{C,3}	160,08 ± 9,52 ^C	0,0399 ± 0,0020
9 meses	C	123,53 ± 5,72 ^{3,6}	248,44 ± 16,44 ^{3,6}	0,0495 ± 0,0041 ^{3,6}
	I	104,01 ± 2,96 ^{C,3}	204,81 ± 6,79 ^{C,3,6}	0,0392 ± 0,0015 ^C
12 meses	C	119,69 ± 4,79 ^{3,6}	237,98 ± 13,70 ³	0,0495 ± 0,0027 ^{3,6}
	I	102,27 ± 2,55 ^{C,3}	205,85 ± 10,81 ^{3,6}	0,0355 ± 0,0015 ^C

Média ± EPM, n=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses ⁶ p < 0,05 vs 6 meses.

Apêndice B – Tabela da Força máxima (N), Rigidez (N/mm) e Resiliência (J) das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos em teste biomecânico.

Parâmetros/ Grupos	Tratamento	Força máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Resiliência (J)
3 meses	C	127,03 ± 8,44	421,49 ± 34,37	0,0354 ± 0,0033
	I	103,51 ± 3,12	347,92 ± 33,34	0,0324 ± 0,0028
6 meses	C	142,59 ± 12,06	439,51 ± 40,06	0,0382 ± 0,0026
	I	151,98 ± 6,53 ³	350,59 ± 36,46	0,0447 ± 0,0054
9 meses	C	168,97 ± 9,91 ³	529,51 ± 8,20 ³	0,0394 ± 0,0045
	I	136,37 ± 3,99 ^{C,3}	408,69 ± 13,30 ^C	0,0353 ± 0,0048
12 meses	C	124,93 ± 11,90 ⁹	491,49 ± 19,29	0,0418 ± 0,0110
	I	153,18 ± 10,84 ³	453,05 ± 40,95	0,0507 ± 0,0050

Média ± EPM, n=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses.

Apêndice C – Tabela do Peso úmido (PU), peso de material orgânico (PMO), volume ósseo (VO), peso das cinzas (Pcinzas), densidade óssea (DO) e densidade mineral (DM) dos fêmures dos animais controles (C) e intoxicados (I) dos diferentes grupos experimentais

Parâmetros		3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
PU (g)	C	0,6516 ± 0,0177	0,7930 ± 0,0223 ³	0,8827 ± 0,0176 ^{3,6}	0,8301 ± 0,0211 ^{3,9}
	I	0,6175 ± 0,0115	0,7794 ± 0,0122 ³	0,8040 ± 0,0066 ^{C,3}	0,8353 ± 0,0179 ^{3,6}
PMO (g)	C	0,1232 ± 0,0034	0,1603 ± 0,0045 ³	0,1797 ± 0,0044 ^{3,6}	0,1657 ± 0,0053 ³
	I	0,1072 ± 0,0090 ^C	0,1594 ± 0,0034 ³	0,1618 ± 0,0049 ^{C,3}	0,1699 ± 0,0029 ³
VO (cm ³)	C	0,4304 ± 0,0104	0,4998 ± 0,0146 ³	0,5491 ± 0,0114 ^{3,6}	0,5361 ± 0,0100 ^{3,6}
	I	0,3908 ± 0,0112 ^C	0,4808 ± 0,0075 ³	0,5134 ± 0,0082 ^{C,3,6}	0,5315 ± 0,0109 ^{3,6}
Pcinzas (g)	C	0,2593 ± 0,0092	0,3474 ± 0,0095 ³	0,3983 ± 0,0100 ^{3,6}	0,3798 ± 0,0133 ^{3,6}
	I	0,2503 ± 0,0058	0,3433 ± 0,0057 ³	0,3515 ± 0,0086 ^{C,3}	0,3888 ± 0,0103 ^{3,6,9}
DO (g/ cm ³)	C	1,5136 ± 0,0086	1,5870 ± 0,0071 ³	1,6079 ± 0,0126 ³	1,5474 ± 0,0153 ⁹
	I	1,5846 ± 0,0193 ^C	1,6210 ± 0,0072	1,5675 ± 0,0194 ⁶	1,5716 ± 0,0111 ⁶
DM (g/ cm ³)	C	0,6020 ± 0,0105	0,6957 ± 0,0093 ³	0,7259 ± 0,0156 ³	0,7073 ± 0,0141 ³
	I	0,6427 ± 0,0136 ^C	0,7141 ± 0,0078 ³	0,6866 ± 0,0241 ³	0,7308 ± 0,0073 ³

Média ± EPM, n=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses.

Apêndice D – Tabela dos Pesos úmido (PU), peso de material orgânico (PMO), volume ósseo (VO), peso das cinzas (Pcinzas), densidade óssea (DO) e densidade mineral (DM) das vértebras dos animais controles (C) e intoxicados (I) dos diferentes grupos experimentais

Parâmetros		3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
PU (g)	C	0,0779 ± 0,0031	0,1006 ± 0,0031 ³	0,1068 ± 0,0052 ³	0,1096 ± 0,0057 ³
	I	0,0852 ± 0,0022	0,0979 ± 0,0024 ³	0,0986 ± 0,0033 ³	0,1093 ± 0,0034 ³
PMO (g)	C	0,0157 ± 0,0006	0,0199 ± 0,0008	0,0242 ± 0,0023 ³	0,0248 ± 0,0035 ³
	I	0,0165 ± 0,0004	0,0195 ± 0,0007	0,0218 ± 0,0045	0,0248 ± 0,0022 ³
VO (cm ³)	C	0,0534 ± 0,0023	0,0695 ± 0,0021 ³	0,0718 ± 0,0040 ³	0,0775 ± 0,0040 ³
	I	0,0611 ± 0,0017 ^C	0,0674 ± 0,0017	0,0682 ± 0,0015	0,0771 ± 0,0022 ^{3,6,9}
Pcinzas (g)	C	0,0252 ± 0,0012	0,0328 ± 0,0017 ³	0,0350 ± 0,0023 ³	0,0333 ± 0,0021 ³
	I	0,0240 ± 0,0007	0,0320 ± 0,0007 ³	0,0299 ± 0,0022 ³	0,0352 ± 0,0016 ³
DO (g/ cm ³)	C	1,4597 ± 0,0148	1,4479 ± 0,0219	1,4910 ± 0,0235	1,4151 ± 0,0166 ⁹
	I	1,3961 ± 0,0062 ^C	1,4523 ± 0,0107 ³	1,4425 ± 0,0212	1,4172 ± 0,0103
DM (g/ cm ³)	C	0,4744 ± 0,0241	0,4716 ± 0,0222	0,4924 ± 0,0367	0,4370 ± 0,0324
	I	0,3929 ± 0,0092 ^C	0,4752 ± 0,0110 ³	0,4398 ± 0,0337	0,4573 ± 0,0189

Média ± EPM, n=7-10; ^C p < 0,05 vs respectivo controle, ³ p < 0,05 vs 3 meses, ⁶ p < 0,05 vs 6 meses, ⁹ p < 0,05 vs 9 meses.

Apêndice E – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 3 MESES CONTROLE

3 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	75	263	34,10	0,7470	0,3084	0,1418	0,4840	1,5434	0,6372	87,10	166,7	0,0418
	64	222	33,00	0,6537	0,2575	0,1243	0,4330	1,5097	0,5947	70,50	108,8	0,0390
	65	229	33,00	0,6344	0,2436	0,1189	0,4258	1,4899	0,5721	63,50	129,3	0,0274
	68	248	33,20	0,6347	0,2570	0,1211	0,4163	1,5246	0,6173	67,20	129,7	0,0281
	76	249	32,50	0,6589	0,2694	0,1236	0,4296	1,5338	0,6271	93,00	165,0	0,0452
	64	225	31,65	0,5940	0,2366	0,1132	0,3925	1,5134	0,6028	66,10	117,2	0,0279
	61	222	31,40	0,6384	0,2426	0,1196	0,4313	1,4802	0,5625	88,40	158,0	0,0435
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	67,57	236,86	32,69	0,6516	0,2593	0,1232	0,4304	1,5136	0,6020	76,54	139,24	0,0361
DP	5,80	16,32	0,9329	0,0470	0,0244	0,0090	0,0275	0,0228	0,0277	12,42	23,71	0,0080
EPM	2,19	6,17	0,3526	0,0177	0,0092	0,0034	0,0104	0,0086	0,0105	4,70	8,96	0,0030

Apêndice F – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 3 MESES INTOXICADO

3 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	69	224	33,45	0,6384	0,2613	0,1009	0,4164	1,5331	0,6275	80,20	181,00	0,0309
	77	216	32,75	0,5707	0,2361	0,0725	0,3425	1,6663	0,6893	76,60	105,70	0,0372
	70	238	33,35	0,5947	0,2545	0,0920	0,3676	1,6178	0,6923	89,80	142,80	0,0537
	74	228	32,75	0,5949	0,2534	0,0800	0,3778	1,5746	0,6707	75,30	121,30	0,0394
	65	224	33,60	0,5885	0,2520	0,0847	0,3765	1,5631	0,6693	91,00	172,60	0,0534
	77	230	32,75	0,6467	0,2700	0,1011	0,4342	1,4894	0,6218	82,10	120,30	0,0426
	77	242	34,00	0,6628	0,2784	0,1241	0,4257	1,5570	0,6540	88,00	175,60	0,0370
	67	234	32,70	0,6766	0,2415	0,1631	0,4395	1,5395	0,5495	73,30	121,80	0,0485
	64	235	32,35	0,6146	0,2425	0,1121	0,3775	1,6281	0,6424	60,70	105,10	0,0320
	55	219	32,40	0,5870	0,2134	0,1410	0,3499	1,6776	0,6099	71,50	141,80	0,0322
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MED	69,50	229,00	33,01	0,6175	0,2503	0,1072	0,3908	1,5846	0,6427	78,85	138,80	0,0407
DP	7,12	8,38	0,5522	0,0363	0,0183	0,0285	0,0353	0,0609	0,0431	9,40	28,81	0,0086
EPM	2,25	2,65	0,1746	0,0115	0,0058	0,0090	0,0112	0,0193	0,0136	2,97	9,11	0,0027

Apêndice G – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 6 MESES CONTROLE

6 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	78	296	37,35	0,8153	0,3496	0,1589	0,5155	1,5816	0,6782	97,70	184,10	0,0319
	61	253	34,60	0,7000	0,3163	0,1418	0,4347	1,6103	0,7276	95,10	189,40	0,0372
	75	280	35,90	0,8571	0,3719	0,1721	0,5440	1,5756	0,6836	101,10	221,80	0,0336
	78	300	36,55	0,8506	0,3846	0,1684	0,5268	1,6147	0,7301	118,10	248,30	0,0466
	73	271	37,05	0,7833	0,3342	0,1614	0,5008	1,5641	0,6673	104,20	203,00	0,0364
	68	268	35,15	0,7312	0,3218	0,1478	0,4605	1,5878	0,6988	105,80	176,60	0,0493
	68	303	37,00	0,8132	0,3532	0,1716	0,5164	1,5747	0,6840	114,40	240,70	0,0404
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	71,57	281,57	36,23	0,7930	0,3474	0,1603	0,4998	1,5870	0,6957	105,20	209,13	0,0393
DP	6,24	18,80	1,0452	0,0590	0,0252	0,0118	0,0387	0,0189	0,0245	8,44	28,29	0,0065
EPM	2,36	7,11	0,3950	0,0223	0,0095	0,0045	0,0146	0,0071	0,0093	3,19	10,69	0,0025

Apêndice H – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 6 MESES INTOXICADO

6 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	75	293	36,35	0,7706	0,3331	0,1624	0,4823	1,5978	0,6906	83,60	137,10	0,0327
	74	280	36,75	0,8179	0,3645	0,1696	0,4976	1,6437	0,7325	98,10	175,90	0,0388
	65	275	35,70	0,7906	0,3563	0,1631	0,4818	1,6409	0,7395	99,00	184,90	0,0510
	74	279	36,40	0,7881	0,3487	0,1544	0,481	1,6385	0,7249	96,60	172,30	0,0337
	64	264	35,55	0,7826	0,3332	0,1612	0,4923	1,5897	0,6768	83,70	110,00	0,0440
	71	287	36,60	0,8195	0,3578	0,1717	0,5092	1,6094	0,7027	99,50	176,10	0,0397
	54	269	35,00	0,7499	0,3358	0,1489	0,4607	1,6277	0,7289	94,10	142,70	0,0404
	55	281	35,50	0,7156	0,3166	0,1441	0,4416	1,6205	0,7169	90,40	181,60	0,0390
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	66,50	278,50	35,98	0,7794	0,3433	0,1594	0,4808	1,6210	0,7141	93,13	160,08	0,0399
DP	8,47	9,29	0,6262	0,0345	0,01618	0,00964	0,0213	0,0204	0,022	6,55	26,92	0,0058
EPM	2,99	3,28	0,2214	0,0122	0,0057	0,0034	0,0075	0,0072	0,0078	2,31	9,52	0,0020

Apêndice I – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 9 MESES CONTROLE

9 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	60	312	37,30	0,8549	0,3810	0,1711	0,5351	1,5976	0,7120	105,70	232,10	0,038
	67	298	36,25	0,8534	0,3728	0,1684	0,5403	1,5795	0,6900	116,30	203,30	0,0486
	67	350	38,00	0,9642	0,4206	0,1844	0,6116	1,5765	0,6877	131,30	301,50	0,0452
	69	334	36,90	0,9252	0,4370	0,1908	0,5585	1,6566	0,7825	128,00	268,40	0,0568
	70	304	37,60	0,8574	0,3749	0,1869	0,5425	1,5805	0,6911	151,60	300,40	0,0705
	73	338	36,90	0,8890	0,4201	0,1926	0,5399	1,6466	0,7781	119,20	240,40	0,043
	57	307	37,45	0,8348	0,3819	0,1634	0,5160	1,6178	0,7401	112,60	193,00	0,0446
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	66,14	320,43	37,20	0,8827	0,3983	0,1797	0,5491	1,6079	0,7259	123,53	248,44	0,0495
DP	5,67	19,97	0,5708	0,0466	0,0266	0,0118	0,0303	0,0332	0,0414	15,15	43,51	0,0109
EPM	2,14	7,55	0,2157	0,0176	0,0100	0,0044	0,0114	0,0126	0,0156	5,7252	16,44	0,0041

Apêndice J – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 9 MESES INTOXICADO

9 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	60	316	35,20	0,8042	0,3021	0,1382	0,5503	1,4614	0,5490	93,40	187,50	0,0396
	61	295	36,00	0,7964	0,3647	0,1585	0,4963	1,6047	0,7348	106,60	206,60	0,0375
	62	295	37,15	0,8375	0,3629	0,1804	0,5331	1,5710	0,6807	99,50	200,60	0,0386
	59	324	35,85	0,7796	0,3479	0,1656	0,4892	1,5936	0,7112	112,30	212,60	0,0355
	60	308	36,00	0,8057	0,3656	0,1626	0,4999	1,6117	0,7313	95,70	187,50	0,0349
	67	268	37,00	0,7972	0,3555	0,1699	0,5142	1,5504	0,6914	112,80	239,80	0,0416
	54	284	36,00	0,8071	0,3618	0,1575	0,5110	1,5795	0,7080	107,80	199,10	0,0466
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	60,43	298,57	36,17	0,8040	0,3515	0,1618	0,5134	1,5675	0,6866	104,01	204,81	0,0392
DP	3,87	19,20	0,6806	0,0175	0,0227	0,0130	0,0217	0,0512	0,0638	7,84	17,97	0,0040
EPM	1,46	7,26	0,2572	0,0066	0,0086	0,0049	0,0082	0,0194	0,0241	2,96	6,79	0,0015

Apêndice K – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 12 MESES CONTROLE

12 meses	(g)	(g)	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	MC ini.	MC final	Comp.	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	66	339	37,20	0,8952	0,4297	0,1822	0,5682	1,5755	0,7562	143,90	305,10	0,0579
	61	360	36,80	0,8917	0,4176	0,1833	0,5452	1,6355	0,7660	114,60	251,30	0,06
	69	328	37,00	0,8476	0,3895	0,1695	0,5501	1,5408	0,7081	122,50	262,00	0,0454
	62	329	37,00	0,7867	0,3589	0,1533	0,5132	1,5329	0,6993	114,00	230,30	0,0491
	68	292	35,55	0,7414	0,3324	0,1481	0,489	1,5162	0,6798	105,30	190,20	0,0492
	75	324	36,70	0,8285	0,3698	0,1627	0,5453	1,5193	0,6782	128,00	232,20	0,0504
	61	320	35,45	0,7668	0,3320	0,1473	0,5116	1,4988	0,6489	102,30	185,20	0,0389
	68	292	36,70	0,8828	0,4083	0,1795	0,5658	1,5603	0,7216	126,90	247,50	0,0426
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	66,25	323,00	36,55	0,8301	0,3798	0,1657	0,5361	1,5474	0,7073	119,69	237,98	0,0495
DP	4,83	22,73	0,6703	0,0596	0,03759	0,01511	0,0283	0,0433	0,0399	13,54	38,75	0,0076
EPM	1,71	8,04	0,2370	0,0211	0,0133	0,0053	0,0100	0,0153	0,0141	4,79	13,70	0,0027

Apêndice L – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos dos fêmures dos animais do GRUPO 12 MESES INTOXICADO

12 meses	(g) MC ini.	(g) MC final	(mm) Comp.	(g) P. úmido	(g) P. cinzas	(g) P. MO	(cm ³) VO	(g/cm ³) DO	(g/cm ³) DM	(N) F. Máx.	(N/mm) Rigidez	(J) Resiliência
	72	280	34,65	0,7410	0,3337	0,1563	0,489	1,5153	0,6824	91,30	153,30	0,0386
	68	337	37,30	0,8988	0,4323	0,1772	0,5639	1,5939	0,7666	108,50	239,60	0,0315
	65	320	36,65	0,9076	0,4204	0,1847	0,5843	1,5533	0,7195	110,70	204,30	0,0409
	67	321	37,35	0,8792	0,4221	0,1732	0,5671	1,5503	0,7443	102,80	226,00	0,0309
	60	390	37,00	0,8904	0,4129	0,1800	0,5492	1,6213	0,7518	105,10	216,20	0,0319
	65	263	36,10	0,7779	0,3541	0,1706	0,4844	1,6059	0,7310	92,20	191,60	0,0314
	70	338	36,75	0,8064	0,3746	0,1589	0,5199	1,5511	0,7205	89,80	151,90	0,0414
	59	299	37,50	0,8010	0,3708	0,1650	0,5173	1,5484	0,7168	107,20	211,70	0,0418
	59	380	37,00	0,8131	0,3741	0,1651	0,5033	1,6155	0,7433	109,90	260,20	0,0357
	50	347	36,70	0,8374	0,3925	0,1676	0,5364	1,5611	0,7317	105,20	203,70	0,0310
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MED	63,50	327,50	36,70	0,8353	0,3888	0,1699	0,5315	1,5716	0,7308	102,27	205,85	0,0355
DP	6,55	40,24	0,8280	0,0567	0,0326	0,0091	0,0343	0,0351	0,0232	8,07	34,19	0,0047
EPM	2,07	12,72	0,2618	0,0179	0,0103	0,0029	0,0109	0,0111	0,0073	2,55	10,81	0,0015

Apêndice M – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 3 MESES

CONTROLE

3 meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	6,00	0,0777	0,0301	0,0154	0,0504	1,5417	0,5972	145,30	439,3	0,0446
	6,35	0,0930	0,0289	0,0182	0,0653	1,4242	0,4426	140,00	298,6	0,0413
	5,50	0,0664	0,0232	0,0129	0,0453	1,4658	0,5121	152,80	543,8	0,0397
	5,70	0,0745	0,0237	0,0153	0,0512	1,4551	0,4629	109,00	367,2	0,0306
	5,75	0,0807	0,0253	0,0163	0,0553	1,4593	0,4575	136,90	502,6	0,0298
	6,00	0,0786	0,0246	0,0154	0,0545	1,4422	0,4514	112,80	333,4	0,0419
	5,75	0,0745	0,0207	0,0162	0,0521	1,4299	0,3973	92,40	465,5	0,0201
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	5,86	0,0779	0,0252	0,0157	0,0534	1,4597	0,4744	127,03	421,49	0,0354
DP	0,276	0,0081	0,0033	0,0016	0,0062	0,0392	0,0638	22,32	90,92	0,0088
EPM	0,104	0,0031	0,0012	0,0006	0,0023	0,0148	0,0241	8,44	34,37	0,0033

Apêndice N – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 3 MESES INTOXICADO

3 meses	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)	
Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência	
6,50	0,0846	0,0248	0,0178	0,0596	1,4195	0,4161	109,70	255,60	0,0429	
6,50	0,0808	0,0211	0,0169	0,0591	1,3672	0,3570	85,70	312,00	0,0285	
6,00	0,0799	0,0220	0,0166	0,0577	1,3847	0,3813	99,10	473,60	0,0187	
6,45	0,0820	0,0264	0,0152	0,0579	1,4162	0,4560	101,50	198,30	0,0417	
6,15	0,0865	0,0253	0,0154	0,0625	1,3840	0,4048	93,80	510,10	0,0335	
6,35	0,0851	0,0248	0,0160	0,0606	1,4043	0,4092	111,10	311,70	0,0433	
6,00	0,0867	0,0236	0,0168	0,0611	1,4190	0,3863	104,40	404,00	0,0251	
6,60	0,0940	0,0252	0,0175	0,0672	1,3988	0,3750	100,10	258,90	0,0342	
6,50	0,0987	0,0265	0,0184	0,0721	1,3689	0,3675	108,60	301,30	0,0346	
6,50	0,0737	0,0198	0,0147	0,0527	1,3985	0,3757	121,10	453,70	0,0219	
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
MED	6,36	0,0852	0,0240	0,0165	0,0611	1,3961	0,3929	103,51	347,92	0,0324
DP	0,2229	0,0071	0,0023	0,0012	0,0054	0,0195	0,0292	9,88	105,43	0,0088
EPM	0,0705	0,0022	0,0007	0,0004	0,0017	0,0062	0,0092	3,12	33,34	0,0028

Apêndice O – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 6 MESES

CONTROLE

6 meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	7,00	0,1078	0,0339	0,0214	0,0747	1,4431	0,4538	136,80	418,60	0,035
	6,85	0,0960	0,0353	0,0210	0,0623	1,5409	0,5666	152,20	498,90	0,045
	6,45	0,1095	0,0375	0,0221	0,0731	1,4979	0,5130	200,30	634,70	0,0498
	7,00	0,1069	0,0370	0,0210	0,0744	1,4368	0,4973	160,30	405,80	0,0303
	6,70	0,1023	0,0305	0,0187	0,0739	1,3843	0,4127	103,40	308,80	0,0337
	6,00	0,0873	0,0252	0,0158	0,0633	1,3791	0,3981	123,70	453,50	0,0396
	6,60	0,0946	0,0299	0,0196	0,0651	1,4531	0,4593	121,40	356,30	0,0339
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	6,66	0,1006	0,0328	0,0199	0,0695	1,4479	0,4716	142,59	439,51	0,0382
DP	0,3541	0,0082	0,0044	0,0022	0,0057	0,0579	0,0588	31,92	105,99	0,0070
EPM	0,1338	0,0031	0,0017	0,0008	0,0021	0,0219	0,0222	12,06	40,06	0,0026

Apêndice P – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 6 MESES INTOXICADO

6 meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	7,25	0,1041	0,0309	0,0207	0,074	1,4068	0,4176	128,30	421,50	0,0211
	6,70	0,0890	0,0301	0,0172	0,0608	1,4638	0,4951	176,10	374,00	0,0403
	6,50	0,0995	0,0329	0,0199	0,0675	1,4741	0,4874	177,30	455,00	0,0694
	7,50	0,1057	0,0364	0,0221	0,0702	1,5057	0,5185	153,20	433,10	0,0352
	6,00	0,0887	0,0308	0,0161	0,0623	1,4238	0,4944	128,60	127,90	0,0407
	7,45	0,1043	0,0328	0,0209	0,0722	1,4446	0,4543	145,90	347,70	0,0584
	6,80	0,0982	0,0312	0,0200	0,0678	1,4484	0,4602	156,00	323,20	0,0367
	6,35	0,0936	0,0306	0,0192	0,0645	1,4512	0,4744	150,40	322,30	0,0554
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	6,82	0,0979	0,0320	0,0195	0,06741	1,4523	0,4752	151,98	350,59	0,0447
DP	0,5418	0,0068	0,00206	0,00198	0,00467	0,03029	0,0311	18,47	103,12	0,0154
EPM	0,1915	0,0024	0,0007	0,0007	0,0017	0,0107	0,0110	6,53	36,46	0,0054

**Apêndice Q – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 9 MESES
CONTROLE**

9 meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	7,00	0,1119	0,0362	0,0241	0,0786	1,4237	0,4606	175,10	508,10	0,0432
	7,00	0,1095	0,0342	0,0210	0,0774	1,4147	0,4419	160,20	515,70	0,0366
	7,65	0,1240	0,0418	0,0244	0,0848	1,4623	0,4929	158,70	559,80	0,0333
	7,30	0,1162	0,0407	0,0260	0,0752	1,5452	0,5412	221,20	516,20	0,0632
	6,45	0,0883	0,0266	0,0232	0,0595	1,4840	0,4471	142,10	553,70	0,0345
	7,00	0,1101	0,0274	0,0357	0,0720	1,5292	0,3806	176,50	542,00	0,0401
	7,00	0,0874	0,0378	0,0153	0,0554	1,5776	0,6823	149,00	511,10	0,0250
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	7,06	0,1068	0,0350	0,0242	0,0718	1,4910	0,4924	168,97	529,51	0,0394
DP	0,3634	0,0138	0,0060	0,0061	0,0106	0,0621	0,0971	26,22	21,69	0,0120
EPM	0,1373	0,0052	0,0023	0,0023	0,0040	0,0235	0,0367	9,9108	8,20	0,0045

Apêndice R – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 9 MESES INTOXICADO

9 meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	6,50	0,0819	0,0321	0,0023	0,0609	1,3448	0,5271	139,30	371,10	0,0272
	7,30	0,1028	0,0184	0,0400	0,0675	1,5230	0,2726	115,00	450,00	0,0219
	7,10	0,1107	0,0350	0,0265	0,0747	1,4819	0,4685	148,50	457,80	0,0311
	7,00	0,0961	0,0357	0,0151	0,0675	1,4237	0,5289	132,50	414,00	0,0215
	7,00	0,1025	0,0290	0,0264	0,0701	1,4622	0,4137	141,60	367,40	0,0487
	6,50	0,0970	0,0322	0,0172	0,0684	1,4181	0,4708	138,00	403,80	0,0510
	6,75	0,0989	0,0272	0,0253	0,0685	1,4438	0,3971	139,70	396,70	0,0457
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MED	6,88	0,0986	0,0299	0,0218	0,0682	1,4425	0,4398	136,37	408,69	0,0353
DP	0,3053	0,0088	0,0059	0,0118	0,0041	0,0561	0,0893	10,56	35,19	0,0128
EPM	0,1154	0,0033	0,0022	0,0045	0,0015	0,0212	0,0337	3,99	13,30	0,0048

Apêndice S – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 12 MESES
CONTROLE

12										
meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	7,10	0,1162	0,0306	0,0338	0,08	1,4525	0,3825	140,60	505,70	0,0332
	7,75	0,1375	0,0378	0,0344	0,0971	1,4161	0,3893	169,60	540,10	0,1115
	7,35	0,1131	0,0421	0,0204	0,078	1,4500	0,5397	120,50	513,10	0,0584
	7,25	0,1025	0,0382	0,0175	0,0725	1,4138	0,5269	107,30	475,90	0,0219
	6,70	0,0944	0,0329	0,0138	0,0687	1,3741	0,4789	84,90	417,50	0,0188
	7,55	0,1232	0,0260	0,0323	0,0903	1,3643	0,2879	93,40	440,30	0,0283
	7,20	0,0884	0,0337	0,0115	0,065	1,3600	0,5185	108,30	456,90	0,0210
	6,70	0,1013	0,0253	0,0349	0,068	1,4897	0,3721	174,80	582,40	0,0413
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MED	7,20	0,1096	0,0333	0,0248	0,07745	1,4151	0,4370	124,93	491,49	0,0418
DP	0,3703	0,0161	0,00594	0,01001	0,01136	0,04703	0,0916	33,66	54,55	0,0310
EPM	0,1309	0,0057	0,0021	0,0035	0,0040	0,0166	0,0324	11,90	19,29	0,0110

Apêndice T – Parâmetros biométricos, biofísicos e biomecânicos da quinta vértebra lombar dos animais do GRUPO 12 MESES INTOXICADO

meses	(mm)	(g)	(g)	(g)	(cm ³)	(g/cm ³)	(g/cm ³)	(N)	(N/mm)	(J)
	Altura	P. úmido	P. cinzas	P. MO	VO	DO	DM	F. Máx.	Rigidez	Resiliência
	6,60	0,0989	0,0293	0,0230	0,0709	1,3949	0,4133	154,80	379,90	0,0776
	7,25	0,1284	0,0291	0,0439	0,0878	1,4624	0,3314	232,90	680,30	0,0560
	7,00	0,1062	0,0378	0,0231	0,0731	1,4528	0,5171	155,80	465,30	0,0437
	6,75	0,1131	0,0412	0,0218	0,078	1,4500	0,5282	174,90	624,00	0,0511
	7,30	0,1226	0,0427	0,0244	0,0873	1,4044	0,4891	135,70	330,20	0,0466
	7,00	0,1069	0,0322	0,0237	0,078	1,3705	0,4128	140,00	295,00	0,0472
	7,60	0,1187	0,0415	0,0255	0,0832	1,4267	0,4988	156,30	497,00	0,0391
	6,60	0,1014	0,0336	0,0211	0,0723	1,4025	0,4647	154,60	429,60	0,0691
	7,00	0,0990	0,0313	0,0203	0,072	1,3750	0,4347	107,00	317,00	0,0199
	6,70	0,0980	0,0330	0,0212	0,0684	1,4327	0,4825	119,80	512,20	0,0565
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MED	6,98	0,1093	0,0352	0,0248	0,0771	1,4172	0,4573	153,18	453,05	0,0507
DP	0,3302	0,0109	0,0052	0,0069	0,0070	0,0326	0,0599	34,28	129,50	0,0159
EPM	0,1044	0,0034	0,0016	0,0022	0,0022	0,0103	0,0189	10,84	40,95	0,0050

Apêndice U – Probabilidades do teste estatístico da massa corporal inicial dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,54757	0,24254	0,73806	0,6884	0,0523	0,6996	0,2635
3 I			0,51842	0,38083	0,3571	0,0145	0,3606	0,1042
6 C				0,15269	0,1421	0,0028	0,143	0,0301
6 I					0,9174	0,0941	0,9378	0,3988
9 C						0,0951	0,9734	0,4105
9 I							0,1003	0,3394
12 C								0,4218
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice V – Probabilidades do teste estatístico da massa corporal final dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,48788	0,00035	0,0006	3E-05	5E-05	3E-05	2E-05
3 I			8,5E-05	0,00013	3E-05	3E-05	2E-05	2E-05
6 C				0,78594	0,0015	0,1364	0,001	0,0004
6 I					0,0009	0,0968	0,0005	0,0002
9 C						0,0571	0,8201	0,5586
9 I							0,0435	0,0204
12 C								0,6908
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle
 3I = 3 meses intoxicado
 6C = 6 meses controle
 6I = 6 meses intoxicado
 9C = 9 meses controle
 9I = 9 meses intoxicado

Apêndice W – Probabilidades do teste estatístico do comprimento dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,40503	3,2E-05	5,9E-05	2E-05	5E-05	3E-05	2E-05
3 I			5,3E-05	0,00011	2E-05	6E-05	3E-05	3E-05
6 C				0,54249	0,0205	0,8804	0,3988	0,2455
6 I					0,0049	0,6168	0,1764	0,0947
9 C						0,0162	0,1094	0,1912
9 I							0,3511	0,2092
12 C								0,693
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice X – Probabilidades do teste estatístico do peso úmido dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,15557	6E-05	0,00011	2E-05	5E-05	3E-05	3E-05
3 I			5,3E-05	5,9E-05	2E-05	3E-05	3E-05	2E-05
6 C				0,56795	0,0009	0,6442	0,1444	0,108
6 I					0,0002	0,3334	0,0536	0,0374
9 C						0,0028	0,0389	0,0502
9 I							0,2746	0,2182
12 C								0,8273
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle
 3I = 3 meses intoxicado
 6C = 6 meses controle
 6I = 6 meses intoxicado
 9C = 9 meses controle
 9I = 9 meses intoxicado

Apêndice Y – Probabilidades do teste estatístico do peso de material orgânico dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,04531	8E-05	0,00013	2E-05	7E-05	4E-05	3E-05
3 I			5,3E-05	5,9E-05	2E-05	3E-05	3E-05	2E-05
6 C				0,9131	0,0294	0,8463	0,5177	0,2735
6 I					0,0251	0,777	0,4709	0,2442
9 C						0,0404	0,0986	0,2169
9 I							0,619	0,3396
12 C								0,6013
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice Z – Probabilidades do teste estatístico do peso das cinzas dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,50329	5,9E-05	0,00011	2E-05	5E-05	3E-05	3E-05
3 I			5,3E-05	5,9E-05	2E-05	3E-05	3E-05	2E-05
6 C				0,75865	0,0008	0,7582	0,0241	0,0052
6 I					0,0003	0,565	0,0136	0,0026
9 C						0,0016	0,1954	0,4759
9 I							0,0386	0,0097
12 C								0,504
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice AA – Probabilidades do teste estatístico do volume ósseo dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,01259	0,0001	0,00186	2E-05	5E-05	3E-05	3E-05
3 I			5,3E-05	6E-05	2E-05	3E-05	2E-05	3E-05
6 C				0,22065	0,0045	0,3787	0,0333	0,0384
6 I					0,0001	0,048	0,0015	0,0019
9 C						0,036	0,3976	0,3579
9 I							0,1698	0,1858
12 C								0,8932
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice BB – Probabilidades do teste estatístico da densidade óssea dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,0016	0,0013	2,3E-05	7E-05	0,0145	0,0941	0,0186
3 I			0,90766	0,09982	0,2767	0,391	0,092	0,3331
6 C				0,11085	0,2975	0,361	0,0803	0,2996
6 I					0,5114	0,0174	0,0014	0,0126
9 C						0,0672	0,0081	0,0518
9 I							0,3481	0,8617
12 C								0,4086
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice CC – Probabilidades do teste estatístico da densidade mineral dos fêmures dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,03674	6,5E-05	2,8E-05	2E-05	0,0001	4E-05	2E-05
3 I			0,00993	0,00094	0,0002	0,0247	0,0023	0,0002
6 C				0,36637	0,1631	0,6372	0,5445	0,1618
6 I					0,5637	0,1945	0,7199	0,5598
9 C						0,0743	0,3793	0,9734
9 I							0,3128	0,074
12 C								0,3779
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice DD – Probabilidades do teste estatístico da força máxima dos fêmures dos animais dos grupos experimentais, obtida em teste biomecânico

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,66266	3E-05	0,00366	2E-05	4E-05	2E-05	7E-05
3 I			4,5E-05	0,00892	2E-05	7E-05	3E-05	0,0001
6 C				0,03854	0,0014	0,8225	0,008	0,6041
6 I					3E-05	0,0541	4E-05	0,0876
9 C						0,0009	0,4683	0,0004
9 I							0,0059	0,7415
12 C								0,0029
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice EE – Probabilidades do teste estatístico da rigidez dos fêmures dos animais dos grupos experimentais, obtida em teste biomecânico

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,9779	0,00014	0,19401	2E-05	0,0002	3E-05	0,0002
3 I			0,00014	0,21127	2E-05	0,0002	2E-05	0,0002
6 C				0,0053	0,0213	0,8001	0,0741	0,8369
6 I					3E-05	0,0067	5E-05	0,0075
9 C						0,015	0,5116	0,0154
9 I							0,0595	0,9482
12 C								0,0593
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice FF – Probabilidades do teste estatístico da resiliência dos fêmures dos animais dos grupos experimentais, obtida em teste biomecânico

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,27694	0,41505	0,35546	0,0017	0,4086	0,0016	0,8669
3 I			0,73282	0,83313	0,0253	0,714	0,0205	0,2249
6 C				0,87732	0,0142	0,9661	0,0131	0,3493
6 I					0,0182	0,8541	0,016	0,2941
9 C						0,0143	0,9831	0,0011
9 I							0,0135	0,3513
12 C								0,0011
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice GG – Probabilidades do teste estatístico da altura das quintas vértebras lombares dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,00823	0,00012	5,5E-05	2E-05	3E-05	2E-05	3E-05
3 I			0,09661	0,01611	0,0006	0,0083	7E-05	0,002
6 C				0,36989	0,0487	0,2488	0,0082	0,1042
6 I					0,2313	0,7392	0,0605	0,401
9 C						0,3524	0,4276	0,6678
9 I							0,1058	0,5728
12 C								0,2518
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice HH – Probabilidades do teste estatístico do peso úmido das vértebras dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,1719	0,00018	0,00058	3E-05	0,0005	2E-05	2E-05
3 I			0,00826	0,01935	0,0003	0,0185	9E-05	1E-04
6 C				0,62799	0,2482	0,6955	0,1265	0,1243
6 I					0,1292	0,8993	0,0547	0,0559
9 C						0,1463	0,6202	0,6303
9 I							0,0655	0,0656
12 C								0,9616
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice II – Probabilidades do teste estatístico do peso de material orgânico das vértebras dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,79081	0,23376	0,2667	0,0207	0,0929	0,0157	0,0149
3 I			0,32375	0,35834	0,0347	0,1391	0,0273	0,0258
6 C				0,89424	0,2137	0,5605	0,1839	0,1754
6 I					0,187	0,5032	0,1552	0,1498
9 C						0,4566	0,8667	0,8633
9 I							0,4043	0,3903
12 C								0,9939
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice JJ – Probabilidades do teste estatístico do peso das cinzas das vértebras dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,58729	0,00338	0,00704	0,0003	0,0459	0,002	0,0002
3 I			0,00082	0,00189	7E-05	0,0164	0,0004	5E-05
6 C				0,73284	0,3764	0,2578	0,8072	0,3502
6 I					0,2458	0,3869	0,584	0,2251
9 C						0,0566	0,4839	0,9272
9 I							0,1896	0,0506
12 C								0,4583
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice KK – Probabilidades do teste estatístico do volume ósseo das vértebras dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,04279	0,00015	0,00055	4E-05	0,0004	2E-05	2E-05
3 I			0,03695	0,08846	0,0093	0,0687	0,0001	0,0002
6 C				0,58891	0,5333	0,7216	0,0522	0,0553
6 I					0,2786	0,8249	0,0174	0,0197
9 C						0,3591	0,1547	0,1575
9 I							0,0266	0,0293
12 C								0,9244
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle
 3I = 3 meses intoxicado
 6C = 6 meses controle
 6I = 6 meses intoxicado
 9C = 9 meses controle
 9I = 9 meses intoxicado

Apêndice LL – Probabilidades do teste estatístico da densidade óssea das vértebras dos animais dos grupos experimentais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,01301	0,61714	0,73603	0,1618	0,4831	0,0795	0,0894
3 I			0,03803	0,02677	0,0002	0,0577	0,3931	0,3726
6 C				0,84365	0,0784	0,8068	0,18	0,1938
6 I					0,1019	0,6795	0,138	0,152
9 C						0,0526	0,003	0,0035
9 I							0,2457	0,2551
12 C								0,9233
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice MM – Probabilidades do teste estatístico entre os grupos experimentais, da densidade mineral das vértebras dos animais

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,03822	0,93306	0,98153	0,6247	0,3627	0,3368	0,6395
3 I			0,04211	0,03892	0,0131	0,2002	0,2015	0,0894
6 C				0,92047	0,585	0,3862	0,3634	0,677
6 I					0,6175	0,3639	0,3353	0,6373
9 C						0,1847	0,1677	0,3684
9 I							0,9341	0,6108
12 C								0,5797
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice NN – Probabilidades do teste estatístico entre os grupos experimentais, da força máxima das vértebras dos animais, obtida em teste biomecânico

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,08614	0,25612	0,07834	0,0042	0,467	0,8697	0,0713
3 I			0,00676	0,00094	3E-05	0,0202	0,0988	0,0008
6 C				0,4648	0,0625	0,6281	0,2138	0,4394
6 I					0,2147	0,2547	0,062	0,9252
9 C						0,0241	0,0029	0,2209
9 I							0,4035	0,2369
12 C								0,0552
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice OO – Probabilidades do teste estatístico entre os grupos experimentais, da rigidez das vértebras dos animais, obtida em teste biomecânico

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,15489	0,69962	0,15551	0,0405	0,7841	0,176	0,5273
3 I			0,08315	0,95453	0,0008	0,2234	0,0079	0,0502
6 C				0,08507	0,0813	0,537	0,2978	0,772
6 I					0,0009	0,2165	0,0083	0,0522
9 C						0,024	0,4168	0,1256
9 I							0,1178	0,3922
12 C								0,4118
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado

Apêndice PP – Probabilidades do teste estatístico entre os grupos experimentais, da resiliência das vértebras dos animais, obtida em teste biomecânico

X	3 C	3 I	6 C	6 I	9 C	9 I	12 C	12 I
3 C		0,727812	0,731376	0,312684	0,64244	0,98731	0,47494	0,09937
3 I			0,519508	0,194404	0,4457	0,72177	0,31417	0,05376
6 C				0,468508	0,8784	0,73687	0,67376	0,17034
6 I					0,54188	0,31469	0,7227	0,45359
9 C						0,64489	0,76642	0,20542
9 I							0,47734	0,10117
12 C								0,30071
12 I								

LEGENDA

3C = 3 meses controle

3I = 3 meses intoxicado

6C = 6 meses controle

6I = 6 meses intoxicado

9C = 9 meses controle

9I = 9 meses intoxicado