

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar-UNESP/Araraquara

EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO SOBRE A
QUALIDADE ÓSSEA DAS VÉRTEBRAS LOMBARES DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS

LIDIÂNGELA DIAS VILLAR

- São Carlos -
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar-UNESP/Araraquara
LABORATÓRIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA

EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO SOBRE A
QUALIDADE ÓSSEA DAS VÉRTEBRAS LOMBARES DE
RATAS OVARIETOMIZADAS

LIDIÂNGELA DIAS VILLAR

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

Orientadora: Profa. Dra. KEICO OKINO NONAKA

- São Carlos -
2004

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

V719ef

Villar, Lidiângela Dias.

Efeito do fluoreto de sódio sobre a qualidade óssea das
vértebras lombares de ratas ovariectomizadas / Lidiângela
Dias Villar. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2004.

1. Medicina experimental - rata. 2. Osteoporose. 3. Flúor.
4. Biomecânica óssea. I. Título.

CDD: 619.93 (20ª)

Orientadora
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

*“Faz-se ciência com fatos, como uma casa com pedras,
porém, uma acumulação de fatos não é ciência, exatamente
como um monte de pedras não é uma casa.”*

Henry Poincaré

“Ainda pior que a convicção do não,

É a incerteza do talvez,

É a desilusão de um quase!

(...) Se a virtude estivesse mesmo no meio-termo,

O mar não teria ondas,

Os dias seriam nublados

E o arco-íris em tons de cinza.

(...) Desconfie do destino e acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando...

Fazendo que planejando...

Vivendo que esperando...

(Quase- Luiz Fernando Veríssimo)

Aos meus pais, Ailton e Aparecida, e minhas irmãs, Luciene e Leila, por todo amor, carinho e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e oferecer-me oportunidades maravilhosas de crescimento espiritual.

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo e pela oportunidade.

Aos professores do PPG-CF pelos ensinamentos importantes para minha formação acadêmica.

Às Profs(a). Drs(a). Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira (ICB III/ USP), Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo (DCF/UFSCar) e Marisa Narciso Fernandes (DCF/UFSCar), por permitirem, gentilmente, a utilização de equipamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Neuroendocrinologia (pós-graduação e iniciação científica), presentes e antigos, pela ajuda e amizade em todos os momentos. Em especial, à Nina, pelas dicas, conselhos e incentivo constantes.

Ao técnico Sr. Sérgio Dias que torna viáveis as atividades do laboratório.

À turma de pós-graduação e todos os amigos do DCF/UFSCar e UNESP/Araraquara pelos momentos sérios e de descontração compartilhados.

A todos meus amigos: Adriano, Andréia, Araceli, Fagian, Juliana, Júnior, Letícia, Lilian, Natália, Sandra e Tupy, por serem, cada um à sua maneira, partes especiais da minha vida.

Aos órgãos de fomento, CAPES pela concessão da bolsa e FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Hipóteses propostas para os mecanismos moleculares de ação do flúor sobre as células precursoras dos osteoblastos.....	11
Figura 2-	Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444), demonstrando um teste de compressão em corpo vertebral (L ₅) de rato.....	21
Figura 3-	Exemplo de curva carga-deformação, mostrando os diversos parâmetros biomecânicos.....	22
Figura 4-	Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	27
Figura 5-	Relação entre o conteúdo de flúor da tíbia direita das ratas com as concentrações de NaF fornecidas (4 meses de tratamento).....	28
Figura 6-	Conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	30
Figura 7-	Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	31
Figura 8-	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	33
Figura 9-	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	34
Figura 10-	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	35
Figura 11-	Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	37
Figura 12-	Relação entre o conteúdo de flúor da tíbia direita das ratas com as concentrações de NaF fornecidas (6 meses de tratamento).....	38
Figura 13-	Conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	40

Figura 14- Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	41
Figura 15- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	44
Figura 16- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	45
Figura 17- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	46
Figura 18- Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	48
Figura 19- Relação entre o conteúdo de flúor da tíbia direita das ratas com as concentrações de NaF fornecidas (8 meses de tratamento).....	49
Figura 20- Conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	51
Figura 21- Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	52
Figura 22- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	54
Figura 23- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	55
Figura 24- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Grupos e lotes experimentais de acordo com o tratamento e o período em que os animais foram sacrificados.....	17
Tabela 2-	Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	27
Tabela 3-	Conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	29
Tabela 4-	Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	31
Tabela 5- (parte I)	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	32
Tabela 5- (parte II)	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).....	33
Tabela 6-	Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	37
Tabela 7-	Conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	39
Tabela 8-	Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	41
Tabela 9- (parte I)	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	43
Tabela 9- (parte II)	Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).....	43
Tabela 10-	Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	48
Tabela 11-	Conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	50
Tabela 12-	Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).....	52

Tabela 13- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos
(parte I) experimentais (8 meses de tratamento)..... 53

Tabela 13- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos
(parte II) experimentais (8 meses de tratamento)..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

BMC	Conteúdo mineral ósseo
BMD	Densidade mineral óssea.
CaF ₂	Fluoreto de cálcio
Ca ₁₀ F ₂ (PO ₄) ₆	Fluorapatita.
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
EPM	Erro padrão da média.
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
G _I	Proteína G inibitória.
HCl	Ácido clorídrico.
HRT	Terapêutica de reposição hormonal.
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina – I.
J	Joule.
kgf	Kilograma força.
L ₅	Quinta vértebra lombar.
MPa	Megapascal.
N	Newton.
Na ₃ AlF ₆	Criólita.
NaF	Fluoreto de sódio.
NaOH	Hidróxido de sódio.
NO	Óxido nítrico.
OH ⁻	Ânion hidroxila.
OVX	Ovariectomizadas.
PC	Peso corporal
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ .
ppm	Partes por milhão.
PTH	Paratormônio.
PTH 1-34	Paratormônio (primeiros 34 aminoácidos da molécula).
S ₁	Primeira vértebra sacral.
SD	Desvio padrão.
SERM	Modulador seletivo dos receptores de estrógeno.

TGF- β Fator transformante de crescimento - beta.
2N Dois normais.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Tecido ósseo e osteoporose.....	1
1.2	Flúor.....	7
1.3	Modelo experimental de osteoporose pós-menopausal.....	13
1.4	Utilização de Propriedades biomecânicas para inferir a qualidade óssea.....	14
1.5	Objetivo.....	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1	Animais.....	16
2.2	Ovariectomia.....	16
2.3	Protocolo experimental.....	16
2.4	Parâmetros estudados.....	18
2.5	Análise estatística.....	24
3	RESULTADOS.....	26
4	DISCUSSÕES.....	57
5	CONCLUSÕES.....	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7	APÊNDICE.....	72

RESUMO

A osteoporose é caracterizada por perda de massa óssea, seguida de alteração microestrutural do tecido ósseo, de forma a aumentar a propensão do indivíduo a fraturas. Esta patologia atinge principalmente mulheres após a menopausa, com graves conseqüências sociais e econômicas. A utilização de flúor tem demonstrado aumentar a massa óssea, principalmente do esqueleto axial. Contudo, seus efeitos sobre a qualidade óssea ainda são controversos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do flúor, administrado na forma de fluoreto de sódio (NaF), sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas (Ovx), utilizadas como modelo de osteoporose experimental, por meio da análise dos parâmetros biomecânicos, físicos e bioquímicos das vértebras lombares. Ratas Wistar, com 4 meses de idade, foram divididas nos seguintes grupos experimentais: Basal (sacrificado no início do experimento); Intacto; Ovx; Ovx + 20, 40, 60, 80 e 100 ppm de NaF, dissolvidos na água de beber dos animais. Os grupos foram sacrificados após diferentes períodos de tratamento (4, 6 e 8 meses). Foram medidos os parâmetros biométricos, biomecânicos, físicos e bioquímicos do corpo vertebral (L₅) dos animais, bem como o conteúdo de flúor da tíbia direita. A quantidade de flúor encontrada na tíbia direita dos animais mostrou boa correlação numérica com a dosagem administrada, para os três períodos de tratamento. A ovariectomia promoveu um maior ganho de peso corpóreo dos animais; além de provocar uma diminuição dos valores dos parâmetros biomecânicos, físicos e bioquímicos do corpo vertebral, para todos os períodos analisados. O tratamento com flúor em altas dosagens, 60, 80 e 100 ppm de NaF, em períodos de 4 e 8 meses de tratamento promoveu um aumento da massa óssea. Apesar disto, esse aumento não se traduziu em maior resistência mecânica dos ossos, ao passo que para baixas dosagens, 20 e 40 ppm de NaF, administradas por um período de 6 meses, foi verificado um efeito protetor sobre o tecido ósseo, evitando-se, assim, a diminuição dos valores dos parâmetros biomecânicos induzida pela ovariectomia. Em conclusão, este estudo mostrou que o flúor em baixas dosagens pode ser um agente terapêutico promissor na prevenção da osteoporose pós-menopausal humana.

ABSTRACT

Osteoporosis is characterised by a reduced bone mass, followed by microstructural changes in the bone tissue, which increase the susceptibility to bone fractures. This pathology is most commonly found in women after menopause, being responsible for severe social and economic consequences. The use of fluoride has demonstrated the possibility to increase bone mass, especially of the axial skeleton. However, its effects on the bone quality are still controversial. The aim of this work was to investigate the effects of fluoride, as sodium fluoride (NaF), on bone tissue of ovariectomized rats (Ovx), which were used as an experimental model for osteoporosis, through the analysis of biomechanical, physical and biochemical parameters of the lumbar vertebrae. Wistar female rats of four-month age were divided in the following experimental groups: Baseline (sacrificed at the beginning of the experiment); Intact; Ovx; Ovx + 20, 40, 60, 80 and 100 ppm of NaF, delivered in drinking water. These groups were sacrificed after different periods of time (4, 6, and 8 months). Biometrical, biomechanical, physical and biochemical parameters of the vertebral body (L₅) of the animals were measured, together with the fluoride content of the right tibia. Fluoride content present in the right tibia showed a good numerical correlation with the administered dosage for the three different periods of treatment. The ovariectomy promoted a higher body weight gain, and also, a decrease in the values of the biomechanical, physical and biochemical parameters of the vertebral body of the animals for all the periods analysed. Treatment using fluoride at high dosage levels (60, 80, and 100 ppm of NaF) resulted in an increase of bone mass, for the periods of 4 and 8 month of treatment. However, this increase did not induce a higher mechanical resistance of the bones, although at low dosages, 20 and 40 ppm, administered during a 6-month period, a protective effect on the bone tissue was observed, thus preventing a decrease in the biomechanical parameters induced by ovariectomy. As a conclusion, this study showed that low dosages of fluoride can act as a promising therapeutic agent for the prevention of human postmenopausal osteoporosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo e osteoporose

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, dinâmico e vital, que proporciona a integridade mecânica necessária para locomoção e proteção dos órgãos. Além disto, encontra-se intimamente associado à homeostase mineral, constitui-se no sítio primário da hematopoese e dados recentes apontam para um possível papel deste tecido como componente do sistema imune (EINHORN, 1996).

Os ossos são compostos de material orgânico, material mineral (ou inorgânico) e água. A fase orgânica tem múltiplas funções, dentre elas, determina a estrutura e as propriedades mecânicas ósseas e é composta da matriz óssea ou osteóide e das células próprias do tecido ósseo. A matriz óssea, por sua vez, é formada principalmente de colágeno tipo I e outras proteínas, como fatores de crescimento, citoquinas e proteínas da matriz extracelular (osteonectina, osteopontina, sialoproteínas ósseas, osteocalcina, proteoglicanos, fosfoproteínas e proteolipídeos), perfazendo 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 (EINHORN, 1996).

A fase mineral (ou inorgânica) é composta principalmente de um mineral contendo fosfato e cálcio análogo à hidroxiapatita. As pequenas quantidades de impurezas contidas nesta apatita - tais como o carbonato que pode substituir o grupo fosfato, ou os íons cloro e flúor que podem substituir o grupo hidroxila - alteram certas propriedades físicas do cristal, por exemplo a solubilidade, tendo efeitos críticos sobre a função normal (EINHORN, 1996).

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 a um processo de formação e reabsorção do tecido ósseo, que perdura por toda vida do indivíduo, chamado *remodelação óssea* (EINHORN, 1996). É estimado que, no tecido ósseo de adultos, aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical é renovado anualmente (DEMPSTER, 1995).

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) (PARFITT; CHIR, 1987). Essas células possuem receptores para fatores sistêmicos e locais, como paratormônio (PTH) e prostaglandina E₂ (PGE₂), que quando estimulados, fazem com que tais células liberem proteases e exponham uma pequena área de matriz óssea mineralizada (EINHORN, 1996).

A partir de tal evento, ocorre a conversão desta pequena superfície da quiescência para atividade, referida como *ativação*. As células mononucleares do sistema fagocitário são atraídas para esta superfície, ancoram-se e fundem-se, originando os osteoclastos. O estágio seguinte é a *reabsorção*, 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 (PARFITT; CHIR, 1987).

O processo de remodelação óssea é altamente regulado por fatores sistêmicos e locais. Os hormônios reguladores de cálcio - PTH, 1,25-dihidroxitamina D e calcitonina - constituem fatores sistêmicos de relevância para o metabolismo ósseo. Outros hormônios que não participam do metabolismo do cálcio no organismo podem exercer importantes efeitos sobre o esqueleto, dentre eles, hormônio de crescimento, glicocorticóides e hormônios tireoidianos. Contudo, o hormônio sistêmico mais importante na manutenção do *turnover* ósseo normal é o estrógeno. A deficiência estrogênica leva a um aumento do remodelamento ósseo, com reabsorção excedendo a formação, diminuindo a massa óssea, como observado em mulheres pós-menopausadas. Estudos em animais sugerem que o estrógeno age alterando a produção e atividade de fatores locais que regulam os precursores osteoblásticos e osteoclásticos (RAISZ, 1999).

Segundo Burckhardt et al. (1991), a osteoporose pode ser definida como uma patologia caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, provocando um aumento da fragilidade óssea e conseqüente aumento do risco de fraturas.

Com intuito de obter uma definição mais quantitativa para diagnóstico clínico, a partir de 1994, a Organização Mundial da Saúde definiu osteoporose e osteopenia considerando os valores de densidade mineral óssea (BMD). Um indivíduo cuja BMD encontra-se entre 1,1 a 2,5 desvios padrão (SDs) inferior ao valor médio para adultos jovens normais apresenta osteopenia. Já um indivíduo no qual a BMD mensurada esteja abaixo de 2,5 SDs do valor médio para adultos jovens normais deve ser considerado tendo osteoporose e naqueles em que o valor abaixo de 2,5 SDs for acompanhado da existência de uma ou mais fraturas apresenta um quadro de osteoporose estabelecida (PINTO NETO et al., 2002).

Dois fatores determinam o nível de massa óssea na maturidade, o pico de massa óssea, que representa a maior massa óssea atingida como resultado do crescimento normal, e a duração e frequência de perdas ósseas (VÄÄNÄNEN, 1991). Indivíduos que alcançam um maior pico de massa óssea após a adolescência apresentam uma proteção natural do esqueleto quando a densidade óssea declina como resultado do envelhecimento, doenças ou produção diminuída dos esteróides sexuais (KLIBANSKI et al., 2001). Não existe um consenso na literatura sobre a exata idade em que o pico de massa óssea é atingido. Porém, a maioria dos autores relata que o pico de massa óssea é alcançado entre 20-25 anos (ABRAMS, 2003; HENRY; FATAYERJI; EASTELL, 2004). Fatores genéticos, incluindo diferenças relacionadas ao sexo e à raça, e ambientais, como nutrição adequada, exercícios físicos e estilo de vida podem influenciar o pico de massa óssea (VÄÄNÄNEN, 1991).

Ainda outros fatores de risco aceleram a perda de massa óssea como alcoolismo, fumo, doenças crônicas (cirrose, artrite reumatóide), tumores, imobilização prolongada, anorexia nervosa, uso excessivo de corticosteróides e anticonvulsivantes (KAPLAN, 1995).

A osteoporose foi primeiramente categorizada em primária e secundária. A osteoporose primária ocorre quando a perda óssea é consequência direta de desordens do tecido ósseo; afeta mulheres após a menopausa (“pós-menopausal”) e ambos os sexos com o decorrer da idade (“senil”). A osteoporose secundária se refere à perda óssea resultante de quadros clínicos específicos ou utilização de fármacos conhecidos por reduzir a massa óssea. Contudo, como a osteoporose pós-menopausal tem íntima relação com a deficiência de hormônios gonadais, certas condições, como osteoporose causada por amenorréia ou tumores secretores de prolactina, que podem ser legitimamente consideradas como formas de osteoporose secundária, eram tratadas como variações da osteoporose primária (MARCUS, 1996). Adicionalmente, existe um consenso geral de que síndromes raras de osteoporose juvenil, que ocorre em crianças pré-púberes, e osteoporose idiopática, que ocorre em adultos jovens de

ambos os sexos, deveriam ser consideradas como uma entidade separada (KASSEM; MELTON; RIGGS, 1996).

Riggs e Melton (1983) propuseram o termo *osteoporose involucional* para designar a osteoporose ocorrida na idade adulta, em ambos os sexos (75% dos casos de osteoporose primária). Estes mesmos autores subdividiram a osteoporose involucional em duas síndromes distintas, a osteoporose *tipo I* e *tipo II*. A osteoporose tipo I afeta mulheres dentro de 15 a 20 anos após a menopausa, é caracterizada por fraturas em sítios contendo grande quantidade de osso trabecular, tais como corpo vertebral, antebraço distal (fratura de Colles) e tornozelo. Neste subtipo de osteoporose involucional, a deficiência de hormônios gonádicos leva a um aumento do *turnover* ósseo com reabsorção excedendo a formação. A osteoporose tipo II ocorre em homens e mulheres a partir dos 70 anos de idade, as fraturas podem ocorrer em osso trabecular e cortical, sendo a fratura de quadril a mais típica. A redução da massa óssea na osteoporose tipo II encontra-se associada a disfunções do metabolismo características do envelhecimento (formação óssea prejudicada, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais e de vitamina D).

A aumentada morbidade e mortalidade decorrentes da osteoporose e suas complicações impõem um custo de aproximadamente 7 bilhões de dólares/ano para a sociedade australiana, ou seja, o equivalente a um dólar/dia para cada indivíduo naquele país (SEEMAN; EISMAN, 2004). Dados epidemiológicos sobre a incidência de osteoporose na população brasileira são escassos, contudo, um estudo realizado em 1998 indicou que naquele ano, 94.120 pacientes sofreram fraturas vertebrais, 37.700 sofreram fraturas femurais e 37.700 sofreram fraturas de punho. Este mesmo estudo mostra que uma em cada cinco mulheres brasileiras acima de 50 anos de idade tem algum tipo de fratura e relata uma projeção de fraturas osteoporóticas que pode alcançar o índice de 600.000 fraturas/ano, sendo 400.000 vertebrais e 200.000 femurais (CARNEIRO, 2001). Embora a osteoporose seja uma patologia sistêmica, as fraturas

vertebrais são freqüentemente complicações precoces e negligenciadas da doença, associadas à dor e invalidez, portanto, podem ser importantes para prever o risco de fraturas futuras (LIPPUNER, 2003).

Diversas drogas têm sido estudadas como possíveis agentes terapêuticos para osteoporose. A eficácia da *terapêutica de reposição hormonal* (HRT) é bem estabelecida. Adicionalmente, a HRT reduz os sintomas da menopausa e provavelmente, a longo-prazo, diminui a incidência de doenças cardiovasculares. Contudo, efeitos colaterais, como ganho de peso e risco de câncer são preocupantes (WIMALAWANSA, 2000).

O *raloxifeno* é um modulador seletivo dos receptores de estrógeno (SERM) que mimetiza os efeitos benéficos do estrógeno sem estimular tecidos como mama e endométrio. Estudos evidenciam que o raloxifeno diminui o risco de fraturas vertebrais em 40% a 55% em pacientes com osteoporose. Os *bifosfonatos* (etidronato, alendronato e risedronato) são potentes agentes anti-reabsortivos derivados do ácido pirofosfônico, Estudos randomizados e placebo-controlados revelaram que os bifosfonatos aumentam a massa óssea vertebral e femural, além de reduzir o risco de fraturas vertebrais em 30% a 50%. A *calcitonina* de salmão tem demonstrado reduzir o risco de fraturas vertebrais, contudo este agente terapêutico, atualmente, é considerado de segunda linha, tendo em vista que outros agentes terapêuticos produzem resultados mais consistentes. Os *flavonóides* naturais (isoflavona) e semi-sintéticos (ipriflavona) não têm demonstrado efeitos satisfatórios sobre a perda de massa óssea e adicionalmente não reduzem o risco de fraturas. Uma substância análoga ao PTH, contendo os primeiros 34 aminoácidos da molécula (PTH 1-34), parece efetivamente aumentar a massa óssea, bem como reduzir significativamente o risco de fraturas (PINTO NETO et al., 2002).

Outros estudos utilizando doadores de óxido nítrico (NO) e melatonina, em ratos castrados, têm revelado efeito protetor de tais agentes sobre o tecido ósseo (BERTONCELLO, 2001; QUEIROZ, 2002).

O flúor é um agente anabólico que tem sido investigado como agente terapêutico para osteoporose. Em altas doses, o fluoreto estabiliza o cristal mineral ósseo e estimula os osteoblastos a formar novos osteóides, principalmente no osso trabecular. O osso recém-formado é radiograficamente mais denso, no entanto, parece não ser estruturalmente normal, visto que, tem elasticidade e força de tensão diminuídas (KAPLAN, 1995).

Kleerekoper (1996) relata o efeito dose-dependente do flúor sobre o tecido ósseo, podendo ser benéfico, no caso de dosagens limitadas ou prejudicial quando ingerido em grandes concentrações. Este mesmo autor ressalta a necessidade de mais estudos sobre a interação deste agente terapêutico com a resistência óssea.

1.2 Flúor

Considerações gerais

O flúor é um elemento químico, não-metálico, altamente reativo, pertencente ao grupo dos halogênios. É o mais eletronegativo de todos os elementos e pode reagir vigorosamente com a maioria das substâncias oxidáveis. Dado o seu excepcional caráter reativo, o flúor geralmente é encontrado quimicamente ligado a diversas substâncias formando os fluoretos, que fazem parte da composição das rochas ígneas e sedimentares. Estima-se que o flúor constitua aproximadamente 0,06-0,09% do peso das camadas superiores da litosfera. Os minerais primários contendo flúor mais comuns são o fluoreto de cálcio (CaF_2), criólitas (Na_3AlF_6) e fluorapatita ($\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$) (MCDOWELL, 1992).

A maior fonte de flúor para o homem é a água, as rochas contendo flúor sofrem ações intempéricas e desprendem este mineral para as águas subterrâneas. O flúor está presente na água sob a forma de sais de sódio e potássio, sendo que sua concentração varia enormemente de acordo com a localização geográfica. Águas profundas, geotermiais e de regiões vulcânicas apresentam altas concentrações de flúor (MCDOWELL, 1992).

Os efeitos biológicos do flúor, a princípio, ficaram confinados à sua toxicidade. Registros de fluorose, em ruminantes na Islândia, datam do ano 1000, e foram associados à erupções vulcânicas. Em 1931, casos de fluorose crônica endêmica em humanos foram relatados em várias partes do mundo. Gases industriais contendo flúor, resultantes do processamento de bauxita e fosfato de rocha, constituem um perigo à saúde das comunidades que vivem próximas a tais indústrias. Em 1942, os primeiros efeitos benéficos do flúor começaram a serem explorados, estabelecendo-se uma correlação entre a concentração deste mineral na água de beber e a prevalência de cáries (MCDOWELL, 1992).

No início da década de 60, o flúor foi administrado à pacientes com osteoporose e demonstrou aumentar a retenção de cálcio nestes. Porém, estudos histológicos verificaram que a formação óssea aumentada, induzida pelo tratamento com flúor, foi seguida por um aumento da reabsorção óssea, formação excessiva de osteóide e pobre mineralização. Estes resultados conduziram à um decréscimo no interesse pelo uso clínico do flúor. Estudos posteriores, entre o final da década de 60 e início da década de 70, demonstraram que estes efeitos desfavoráveis iniciais do tratamento com flúor dependiam principalmente de três fatores: (a) duração do tratamento, (b) uso de suplementos de cálcio e (c) dose do fluoreto administrado. Otimização da dose e uso de suplementos de cálcio obtiveram melhora significativa dos resultados histológicos. Já nos anos 90, a terapia com flúor sofreu um novo recuo quando estudos duplo-cegos e placebo-controlados verificaram que pacientes com osteoporose tratados com flúor, em altas doses, apresentaram um notável aumento do conteúdo ósseo

mineral (BMC) sem qualquer alteração da taxa de fraturas vertebrais. Tais resultados podem indicar que o flúor tem uma janela terapêutica estreita e seus efeitos sobre o tecido ósseo devem ser investigados em maiores detalhes (ERIKSEN; MELSEN; MOSEKILDE, 1995).

Metabolismo

Após a ingestão, o flúor é absorvido no trato gastrointestinal via mecanismos passivos. A absorção do flúor está relacionada principalmente com a solubilidade do sal de fluoreto ingerido. Fluoretos solúveis, como o fluoreto de sódio (NaF), são quase completamente absorvidos do trato digestivo, enquanto formas de fluoretos menos solúveis ou de liberação lenta, como CaF_2 e fosfato de rocha, são pouco absorvidas (MCDOWELL, 1992). Contudo, fluoretos de liberação lenta, evitam picos da concentração sérica de flúor e reduzem a irritação gastrointestinal, um efeito colateral comum quando se administra NaF (LIBANATI; LAU; BAYLINK, 1996).

A absorção de flúor é aumentada por acidez gástrica e diminuída por administração concomitante de cálcio, magnésio ou alumínio (ERIKSEN; MELSEN; MOSEKILDE, 1995).

A concentração plasmática de flúor é mantida dentro de estreitos limites, controlados principalmente pelos rins e pelo tecido ósseo. Em humanos, aproximadamente 50% do flúor absorvido é excretado na urina, do percentual remanescente, 99% é seqüestrado pelo esqueleto e pelos dentes. A maioria dos tecidos moles e fluidos corpóreos não acumulam quantidades significativas de flúor, apenas os tendões, a aorta e a placenta têm demonstrado acumular tal elemento (MCDOWELL, 1992).

Efeitos sobre o tecido ósseo

O flúor desloca os íons hidroxila (OH⁻) da apatita óssea, formando fluorapatita. Grynpas e Cheng (1988), analisando a dissolução de ossos de ratos tratados com dieta normal e dieta contendo altas quantidades de flúor, constataram que a incorporação de flúor ao tecido ósseo reduz a solubilidade dos ossos em soluções ácidas.

Posner et al. (1994), através de estudos de difração de raios X em ossos humanos contendo quantidades variadas de flúor, demonstraram que a maior estabilidade da apatita nesses ossos devia-se principalmente à melhora da cristalinidade e substituição isomórfica do flúor em sua estrutura. Estes mesmos autores verificaram que a melhora da cristalinidade resulta de um aumento das taxas de crescimento do cristal e de nucleação e que o aumento do conteúdo de flúor dos ossos foi acompanhado por um aumento do tamanho dos cristais ósseos.

O flúor também é conhecido por sua ação mitogênica, promovendo aumento da proliferação e diferenciação de células precursoras dos osteoblastos. Os mecanismos moleculares pelos quais o flúor aumenta a proliferação e diferenciação destas células ainda não são plenamente entendidos, contudo, duas hipóteses de sua ação foram propostas (Figura 1).

Em 1989, estudos demonstraram que fatores de crescimento, como fator transformante de crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), agiriam sobre receptores tirosina quinase, promovendo a dimerização e autofosforilação destes, levando a um conseqüente aumento da fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas sinalizadoras chaves, como as da via Ras/Raf-1/ERK (responsáveis pela ativação de protooncogenes e fatores de transcrição que aumentam a síntese de DNA e a proliferação celular). Neste modelo, o flúor atuaria inibindo a atividade da tirosina fosfatase, permitindo que estas

proteínas sinalizadoras permaneçam fosforiladas por um tempo maior, potenciando a ação dos fatores de crescimento e conseqüentemente a proliferação celular. Já trabalhos posteriores, de 1994, propuseram que a ativação da via Ras/Raf-1/ERK seria mediada por receptores acoplados à proteína G_i e que o flúor teria um papel estimulador deste processo, formando um complexo com o alumínio (fluoraluminato) (CAVERSAZIO; PALMER; BONJOUR, 1998).

Figura 1- Hipóteses propostas para os mecanismos moleculares de ação do flúor sobre as células precursoras dos osteoblastos (CAVERSAZIO; PALMER; BONJOUR, 1998).

Saville (1967) mensurou o conteúdo de cálcio dos membros anteriores, posteriores e do esqueleto axial de ratos que ingeriram 2, 5 e 20 ppm de NaF na água de beber. Este estudo demonstrou que apenas a dose de 20 ppm foi capaz de aumentar o conteúdo de cálcio dos membros anteriores e esqueleto axial.

Beary (1969) constatou um aumento da flexibilidade e redução da força de fêmures de ratas, obtidas em teste de flexão a três pontos, submetidas a uma dieta com baixo conteúdo de cálcio (0,1%), ingerindo 10 e 45 ppm NaF na água de beber.

Wolinsky, Simkin e Guggenheim (1972) verificaram uma redução dos valores dos parâmetros biomecânicos do fêmur (Stress máximo, Limite e Módulo de elasticidade), obtidos através de teste de flexão a três pontos, em ratos jovens tratados com 200 ppm de NaF por um período de 2 semanas.

Riggins, Zeman e Moon (1974) observaram um aumento no diâmetro da tíbia de ratos tratados com flúor (50 e 100 ppm de NaF) que receberam dieta pobre em cálcio (0,1%), sendo tal aumento do diâmetro ósseo associado à formação óssea periosteal. O mesmo estudo demonstrou que a dose de 100 ppm NaF reduziu a força óssea mensurada em teste de torção.

Em ratas tratadas com 100 e 150 ppm NaF por 90 dias, observou-se um aumento da densidade mineral e volume ósseo trabecular das vértebras lombares. Contudo, a qualidade óssea mostrou-se menor nos grupos tratados com flúor (SØOGAARD et al., 1995).

Zhang et al. (2000) investigaram o efeito do fluoreto de sódio, na dose de 1,0 mg de NaF/kg de peso corporal, sobre os parâmetros histomorfométricos da tíbia e vértebras lombares de ratas ovariectomizadas. Tais autores demonstraram um efeito protetor parcial do flúor contra a perda de massa óssea.

Altas concentrações de flúor (50 mg/L) parecem provocar um não-pareamento da mineralização óssea, sendo esse a causa primária da diminuição da força mecânica dos ossos analisados (TURNER et al., 2001).

Diante destas considerações, interessou-nos investigar o efeito do flúor sobre o tecido ósseo em um espectro mais amplo de dosagens e diferentes períodos de ingestão.

1.3 Modelo experimental de osteoporose pós-menopausal

Um modelo experimental de osteoporose pós-menopausal *in vivo* consiste de um animal no qual a perda de massa óssea, devido à deficiência de hormônios ovarianos (natural ou induzida), pode ser estudada e cujas características e seqüelas assemelhem-se àquelas encontradas em mulheres pós-menopausadas em um ou mais aspectos. Desta forma, o modelo experimental de osteoporose pós-menopausal pode não reproduzir exatamente as condições humanas, contudo, é útil para estudar alguns aspectos desta patologia, além de analisar o efeito de possíveis agentes terapêuticos (KALU, 1991).

A utilização de ratas ovariectomizadas (Ovx) como modelo experimental de osteoporose pós-menopausal é amplamente difundida na literatura (KALU, 1991; FROST; JEE, 1992; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; THOMPSON et al., 1995; KIMMEL, 1996). Adicionalmente, outros modelos animais de osteoporose tem sido extensivamente estudados dentre eles camundongos, aves, coelhos, cães, porcos, ovelhas e primatas (KIMMEL, 1996).

Frost e Jee (1992) evidenciam que, apesar de certas limitações, como ausência de remodelamento haversiano e fraturas frágeis, o rato consiste em um bom modelo para o estudo da osteoporose humana, visto que os mecanismos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea são os mesmos em humanos e ratos, e que o esqueleto de ambas espécies reage similarmente a influências mecânicas, hormônios e drogas. Tais autores ressaltam que a utilização de ratas Ovx representaria uma redução de aproximadamente 75% do tempo e 90% do custo comparados a estudos em cães ou primatas.

Kalu (1991) designou *modelo de ratas maduras* aquele baseado em ratas sexualmente maduras de 3 meses de idade. Segundo este autor, os efeitos da ovariectomia no modelo de ratas maduras manifestam-se em um mês ou menos e as características da perda óssea são muito semelhantes àquelas vistas em mulheres após a menopausa (aumento do *turnover*

ósseo, com reabsorção excedendo à formação; grande perda de osso trabecular e uma fase inicial de perda óssea rápida seguida por uma fase de perda óssea mais lenta).

1.4 Utilização de Propriedades biomecânicas para inferir a Qualidade óssea

A qualidade e a massa óssea são igualmente importantes para manutenção da integridade esquelética durante o envelhecimento. A força mecânica do osso é provavelmente o parâmetro mais relevante em relação ao risco de fraturas (PENG et al., 1994).

Quando os ossos são sujeitos a condições de carga experimentais ou fisiológicas, seu comportamento mecânico é dependente não somente da massa do tecido ósseo, mas também de sua geometria e arquitetura (EIHORN, 1996).

Sendo assim, faz-se necessário avaliar as propriedades biomecânicas ósseas a fim de inferir a qualidade óssea. As propriedades biomecânicas são obtidas através de ensaios específicos, sendo o teste de flexão a três pontos em fêmur ou tíbia e teste de compressão em vértebras os mais empregados (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; PENG et al., 1994; KATSUMATA et al., 1995; LEPOLA et al., 1996; IKEDA et al., 2001).

De particular interesse no estudo de doenças metabólicas ósseas são as fraturas do corpo vertebral. Este tipo de fratura resulta, predominantemente, da ação de cargas compressivas no eixo axial. A redução da capacidade de suportar carga das vértebras está relacionada às suas propriedades materiais e à forma como a estrutura trabecular é modificada pelos processos de perda óssea pós-menopausal ou relacionada ao envelhecimento (EIHORN, 1996).

Em consideração ao que foi apresentado anteriormente, resume-se que:

- A osteoporose é uma doença multifatorial que acomete principalmente mulheres após a menopausa, apresentando graves conseqüências sociais e econômicas.

- O flúor pode ser um agente terapêutico promissor para a prevenção da osteoporose. Contudo, seus efeitos sobre o tecido ósseo requerem mais estudos, principalmente em relação à dosagem e tempo de administração.

- A rata Ovx é um modelo experimental adequado para o estudo da osteoporose pós-menopausal humana.

- A correlação entre os parâmetros físicos, bioquímicos e biomecânicos pode inferir satisfatoriamente o estado esquelético.

1.5 Objetivo

Estudar os efeitos do flúor sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, utilizadas como modelo de osteoporose experimental, por meio da análise dos parâmetros biomecânicos, físicos e bioquímicos das vértebras lombares.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

O presente estudo utilizou ratas Wistar, com 4 meses de idade no início do experimento e peso corpóreo médio de 247 ± 7 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos e mantidas no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia/ DCF, em condições de luz e temperatura controlados (10 horas claro /14 horas escuro, temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C). Os animais foram alimentados com ração comercial (Primor® – cálcio 1,5%, fósforo 0,4%, vitamina D₃ 1500 U.I./ kg, quantidade de flúor não significativa) e água à vontade.

Ao término dos diferentes períodos de tratamento (4, 6 e 8 meses), os animais foram sacrificados por decapitação. A tíbia direita e as vértebras foram retiradas e dissecadas de suas partes moles. A quinta vértebra lombar (L₅) foi isolada tendo como referência a articulação da primeira vértebra sacral (S₁). Os ossos foram conservados em salina 0,9% à -20° C até o momento das análises.

2.2 Ovariectomia

As ratas pertencentes aos grupos 3-8 (descritos a seguir) foram ovariectomizadas aos 4 meses de idade, segundo técnica descrita por Zarrow et al. (1964).

2.3 Protocolo experimental

Os animais foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo 1: Basal - ratas sacrificadas no início do experimento para avaliação do crescimento corpóreo real dos animais, (KALU, 1991);
- Grupo 2: Ratas Intactas;
- Grupo 3: Ratas ovariectomizadas + 0 ppm de NaF (Ovx);
- Grupo 4: Ratas ovariectomizadas + 20 ppm de NaF (Ovx + 20);
- Grupo 5: Ratas ovariectomizadas + 40 ppm de NaF (Ovx + 40);
- Grupo 6: Ratas ovariectomizadas + 60 ppm de NaF (Ovx + 60);
- Grupo 7: Ratas ovariectomizadas + 80 ppm de NaF (Ovx + 80);
- Grupo 8: Ratas ovariectomizadas + 100 ppm de NaF (Ovx + 100).

Os grupos tratados com flúor receberam as respectivas doses de fluoreto de sódio (NaF) na água de beber. O tratamento dos animais iniciou-se 24 horas após a ovariectomia.

Todos os grupos designados acima (exceto o Grupo 1) foram sacrificados em 3 lotes, correspondendo a períodos crescentes de ingestão de flúor (4, 6 e 8 meses). A Tabela 1 apresenta o delineamento experimental.

Tabela 1– Grupos e lotes experimentais de acordo com o tratamento e o período em que os animais foram sacrificados.

	<i>Lote A</i>	<i>Lote B</i>	<i>Lote C</i>
Grupo 2 (Inta)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses
Grupo 3 (Ovx)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses
Grupo 4 (Ovx+20 ppm NaF)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses
Grupo 5 (Ovx+40 ppm NaF)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses
Grupo 6 (Ovx+60 ppm NaF)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses
Grupo 7 (Ovx+80 ppm NaF)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses
Grupo 8 (Ovx+100 ppm NaF)	intervalo=4 meses	intervalo=6 meses	intervalo=8 meses

2.4 Parâmetros estudados

2.4.1 Propriedades biométricas

Peso corporal

O peso corporal dos animais foi registrado semanalmente a fim de acompanhar o crescimento e o estado de saúde destes.

Altura do corpo vertebral (L₅)

A altura dos corpos vertebrais (h) dos animais foi mensurada com auxílio de um paquímetro, no momento anterior à realização do teste mecânico de compressão das vértebras.

2.4.2 Propriedades bioquímicas

Conteúdo de Flúor da tíbia direita

As análises químicas do conteúdo de flúor das tíbias direitas dos animais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - UNICAMP.

Os ossos foram desidratados em estufa por 24 horas à 90 °C, em seguida foram triturados e colocados novamente em estufa à 90 °C por mais 24 horas. A extração do flúor foi feita com ácido clorídrico 0,5 M, após 1 hora e sob agitação suave acrescentou-se 0,5 ml de TISAB (Tampão acetato 1,0 M pH 5,0 contendo NaCl e ciclohexilenodiaminotetraacético a

0,4 %). Este tampão complexante de cálcio continha 20 g de NaOH/l para neutralizar o HCl (CURY, 1984).

Para análise do conteúdo de flúor, utilizou-se eletrodo específico Orion 96-09 acoplado a um analisador de íons Orion EA-940, previamente calibrados com padrões de flúor. Determinando-se a concentração de flúor na amostra e sendo conhecido o peso do osso, o resultado foi expresso em ppm ($\mu\text{g F/g}$ de osso).

Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral (L₅)

Após a obtenção do material mineral dos corpos vertebrais dos animais (descrita posteriormente nas propriedades físicas), estes foram solubilizados com ácido clorídrico 2N (1-2 ml). Em seguida, os conteúdos de cálcio e fósforo foram determinados através de ensaio colorimétrico, utilizando-se kits comerciais específicos Labtest®.

2.4.3 Propriedades biomecânicas do corpo vertebral (L₅)

Para realização dos ensaios mecânicos de compressão das vértebras, os processos transversos, o processo espinhoso e o arco vertebral foram retirados de modo a obter somente o corpo vertebral. As extremidades deste corpo foram aplainadas com lixa d'água (Norton 180) e a porção cranial foi identificada com caneta marcadora.

Os ensaios de compressão foram realizados em uma máquina universal Instron, modelo 4444 (Figura 2). Utilizou-se uma célula de carga com capacidade máxima de 100 kgf. Foi aplicada uma pré-carga de 10 N para estabilizar a vértebra (SAMNEGÅRD; AKHTER; RECKER, 2001). A velocidade de aplicação de carga, durante o ensaio, foi constante de 2 mm/min no eixo crânio-caudal (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993;

KATSUMATA et al., 1995; IKEDA et al., 2001) até o esmagamento parcial da vértebra (2/3 da altura média do grupo).

Os valores das cargas aplicadas plotados em função das deformações foram registrados pelo software Instron Series IX, produzindo as curvas carga-deformação (Figura 3). Estas curvas apresentam duas regiões bem distintas, a região de deformação elástica, correspondendo à fase linear da curva e a região de deformação plástica, correspondendo à fase de comportamento variável, onde ocorrem deformações permanentes no tecido ósseo (TURNER; BURR, 1993). A partir de tais curvas foram determinadas as principais propriedades biomecânicas explicitadas a seguir:

Carga máxima (N)

Corresponde à maior carga aplicada durante o ensaio.

Energia absorvida na fase elástica (J)

Corresponde à área sob a curva carga-deformação até o limite elástico (último ponto correspondente à fase elástica da curva), obtida através de integração numérica, também conhecida como Resiliência.

Tenacidade (MPa)

Corresponde à área total sob a curva carga-deformação (região elástica + região plástica), obtida através de integração numérica.



Figura 2- Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444), demonstrando um teste de compressão em corpo vertebral (L₅) de rato. A, célula de carga ligada à ponte de extensometria; B, cilindro de aplicação de carga; C, corpo vertebral; D, suporte; E, painel de controle.

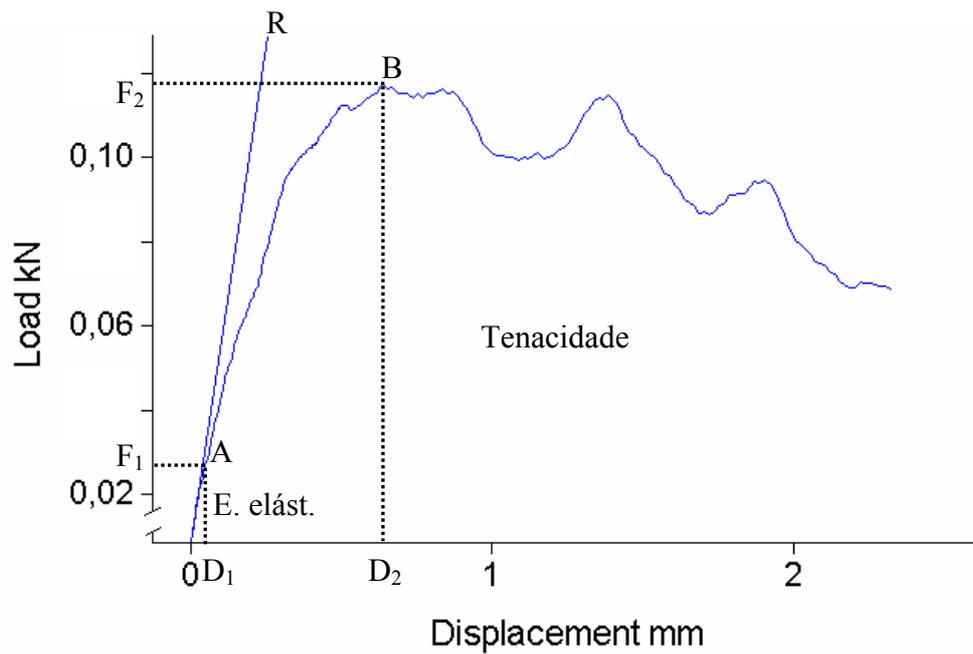


Figura 3- Exemplo de curva carga-deformação, mostrando os diversos parâmetros biomecânicos: A, limite elástico; B, ponto de carga máxima; R, reta ajustada à fase elástica da curva; F₁, força (carga) no limite elástico; D₁, deformação no limite elástico; F₂, força (carga) máxima; D₂, deformação no ponto de força (carga) máxima.

2.4.4 Propriedades físicas do corpo vertebral (L₅)

Os corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos foram mantidos em água destilada e colocados no dessecador por 24 horas para retirada de ar dos poros ósseos. Em seguida obteve-se os pesos imerso (P_i) e úmido (P_u). Tal procedimento foi realizado no momento anterior ao teste mecânico de compressão, visto que, o esmagamento produzido por este dificulta as pesagens.

Após a realização dos ensaios biomecânicos, os corpos vertebrais foram desidratados em estufa (Funbec) à 100° C por 24 horas para obtenção do peso seco (P_s), em seguida, os ossos foram queimados em mufla à 800° C por 24 horas, obtendo-se o peso das cinzas (P_c). Todas as medidas foram realizadas em balança eletrônica (Chyo).

Com base nestes dados, o volume ósseo foi calculado seguindo o princípio de Arquimedes e a partir deste as densidades óssea e mineral puderam ser encontradas. Além destes parâmetros, foram calculados os percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, segundo as fórmulas que seguem (MARTIN, 1990):

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

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

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

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

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

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

Onde:

P_u - Peso do osso úmido (g)

P_i - Peso do osso imerso (g)

P_s - Peso do osso desidratado (g)

P_c - Peso das cinzas ósseas (g)

ρ - Densidade da água (g/cm³)

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos em cada grupo (Média \pm EPM), para cada parâmetro analisado, foram comparados entre si através dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, aplicados pelo software InStat 3.0, adotando o nível de significância $p < 0,05$. A probabilidade do teste obtida em cada comparação encontra-se no apêndice.

Normas técnicas referentes à elaboração deste trabalho

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

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

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do tratamento com diferentes concentrações de flúor, por um período de 4 meses, sobre a osteopenia induzida por ovariectomia em ratas.

Propriedades biométricas

A Tabela 2 e a Figura 4 apresentam os valores de peso corporal inicial e final, ganho de peso corporal e altura do corpo vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Os pesos corporais iniciais dos animais não diferiram entre os grupos. O grupo Ovx apresentou um ganho de peso corporal maior em relação ao grupo Intacto. Comparando-se os grupos de ratas Ovx tratadas com flúor com o grupo Intacto, observa-se um aumento do ganho de peso corporal em todos os grupos; a maioria destes grupos não foi diferente do grupo Ovx para este parâmetro, apenas o grupo Ovx+80 ppm de NaF apresentou uma redução do ganho de peso corporal quando comparado ao grupo Ovx e aos demais tratamentos.

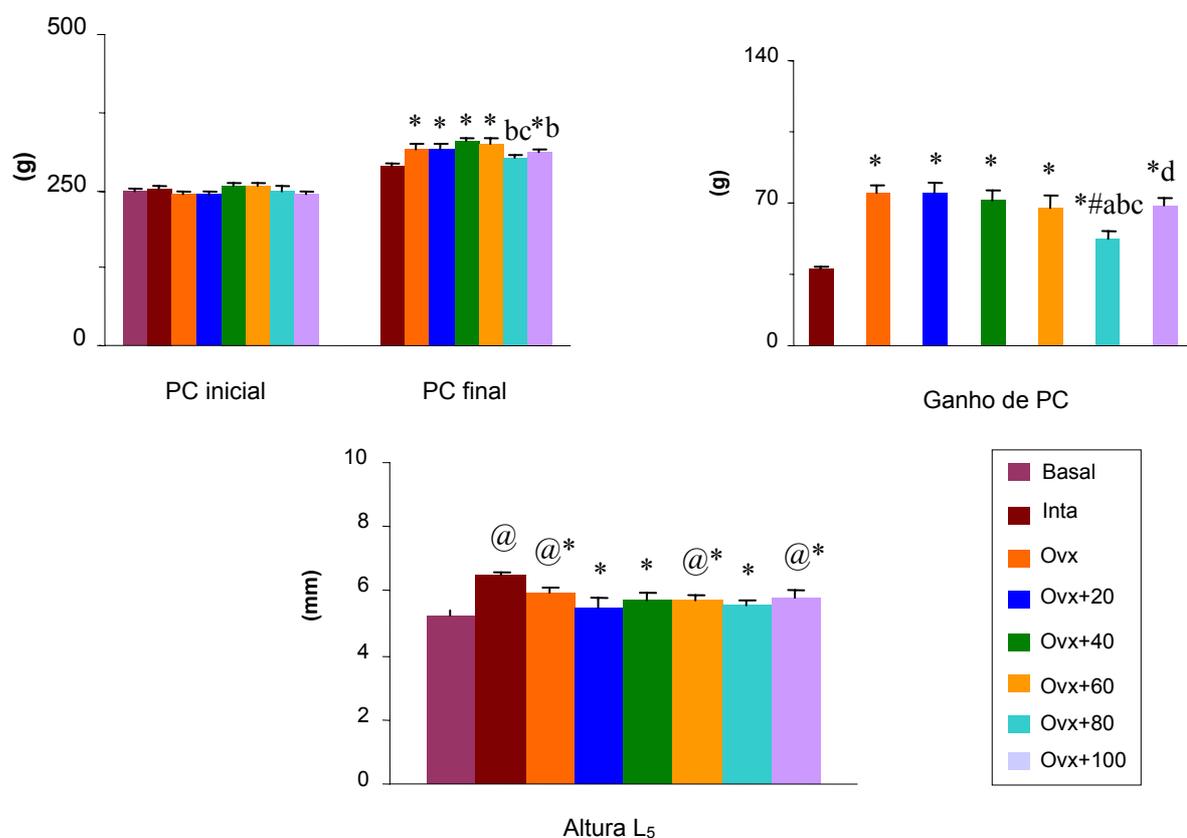
Ocorreu um aumento da altura do corpo vertebral dos animais pertencentes aos grupos Intacto, Ovx, Ovx+60 e Ovx+100 ppm de NaF quando estes foram comparados ao grupo Basal.

Pôde-se observar uma redução da altura do corpo vertebral das ratas, comparando-se o grupo Ovx ao grupo Intacto. Todos os grupos Ovx tratados com flúor apresentaram valores semelhantes aos do grupo Ovx para este parâmetro.

Tabela 2- Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros			
	PC inicial (g)	PC final (g)	Ganho de PC (g)	Altura L ₅ (mm)
Basal (9)	248,0 ± 3,77	—————	—————	5,24 ± 0,13
Inta (8)	251,8 ± 5,26	289,3 ± 5,63	37,5 ± 1,40	6,49 ± 0,11 @
Ovx (10)	241,4 ± 7,34	315,9 ± 8,24 *	74,5 ± 3,77 *	5,96 ± 0,14 @*
Ovx+20 (9)	241,0 ± 4,75	316,2 ± 7,86 *	75,2 ± 4,33 *	5,49 ± 0,27 *
Ovx+40 (7)	257,9 ± 3,57	329,6 ± 3,91 *	71,7 ± 4,03 *	5,69 ± 0,23 *
Ovx+60 (8)	258,8 ± 1,88	326,4 ± 5,50 *	67,6 ± 5,68 *	5,73 ± 0,14@ *
Ovx+80 (7)	249,3 ± 5,44	301,1 ± 5,39 bc	51,9 ± 4,91 ##abc	5,53 ± 0,17 *
Ovx+100 (6)	241,8 ± 6,19	311,0 ± 4,69 *b	69,2 ± 3,27 *d	5,83 ± 0,18 @*

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

**Figura 4-** Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento). Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades bioquímicas

Conteúdo de Flúor da tíbia direita

A Figura 5 exibe a relação entre a quantidade de flúor (ppm) encontrada na tíbia direita dos animais com a dosagem de flúor administrada.

Verificou-se uma correlação linear entre as variáveis, pois, aumentando a concentração de flúor fornecida aos animais, houve um aumento proporcional da incorporação deste mineral no tecido ósseo. O índice de correlação (r) foi 0,9397. Também foi obtida, através de regressão linear, a equação representativa da reta, sendo esta $y_1 = 510,98x - 365,37$.

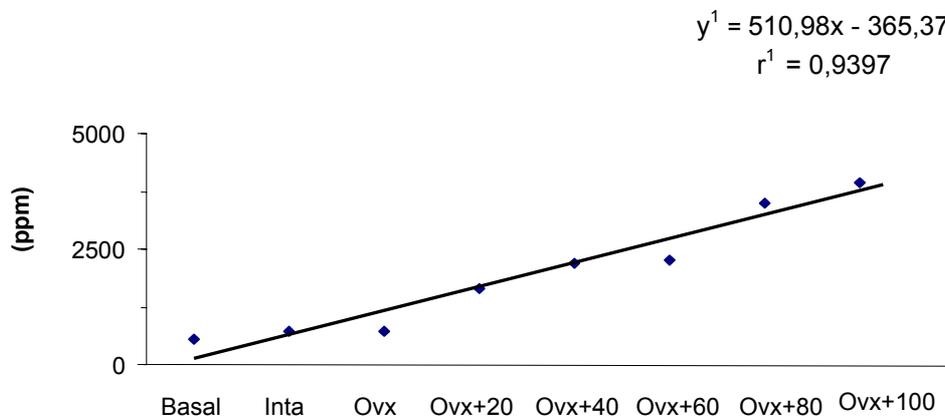


Figura 5- Relação entre o conteúdo de flúor da tíbia direita das ratas com as concentrações de NaF fornecidas (4 meses de tratamento).

Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 3 e a Figura 6 apresentam os valores de conteúdo de cálcio e fósforo dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Observa-se um aumento dos parâmetros analisados nos grupos Intacto, Ovx+60 e Ovx+100 ppm de NaF em relação ao grupo Basal. Uma redução dos conteúdos de cálcio e fósforo foi verificada quando se comparou o grupo Ovx com o grupo Intacto.

Os grupos Ovx+60 e Ovx+100 ppm de NaF apresentaram valores maiores de conteúdo de cálcio em relação ao grupo Ovx, não diferindo do grupo Intacto. As demais dosagens não apresentaram diferenças para os parâmetros bioquímicos estudados.

Tabela 3– Conteúdos de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros	
	Cálcio (mg/vért.)	Fósforo (mg/vért.)
Basal (9)	6,55 ± 0,52	3,57 ± 0,21
Inta (8)	9,57 ± 0,30@	4,63 ± 0,15@
Ovx (10)	7,58 ± 0,49*	3,89 ± 0,23*
Ovx+20 (9)	7,11 ± 0,72*	3,52 ± 0,30*
Ovx+40 (7)	8,52 ± 0,82	3,79 ± 0,33*
Ovx+60 (8)	8,79 ± 0,34@#	4,25 ± 0,17@
Ovx+80 (7)	7,71 ± 0,43*c	3,67 ± 0,18 *c
Ovx+100 (6)	9,11 ± 0,51@#a	4,10 ± 0,28

(n) Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, c vs Ovx+20, 60 ppm NaF, respectivamente.

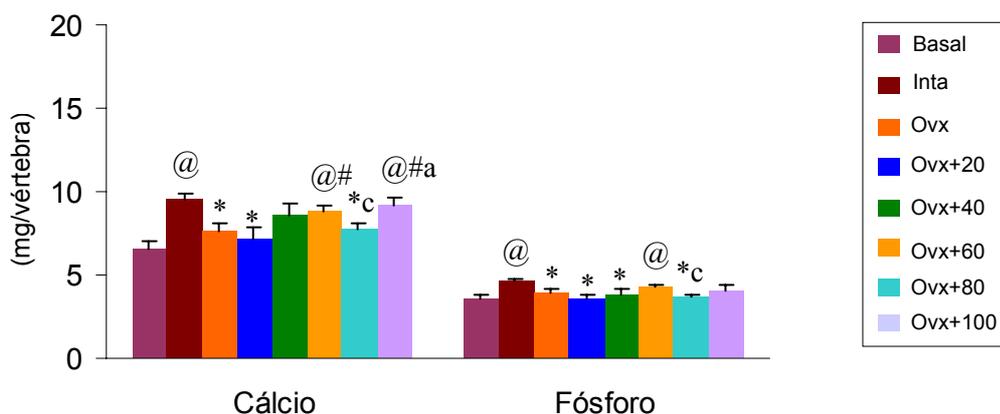


Figura 6– Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, c vs Ovx+20, 60 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades biomecânicas do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 4 e a Figura 7 apresentam os valores dos parâmetros biomecânicos dos corpos vertebrais das ratas dos diferentes grupos experimentais, obtidos com o teste de compressão.

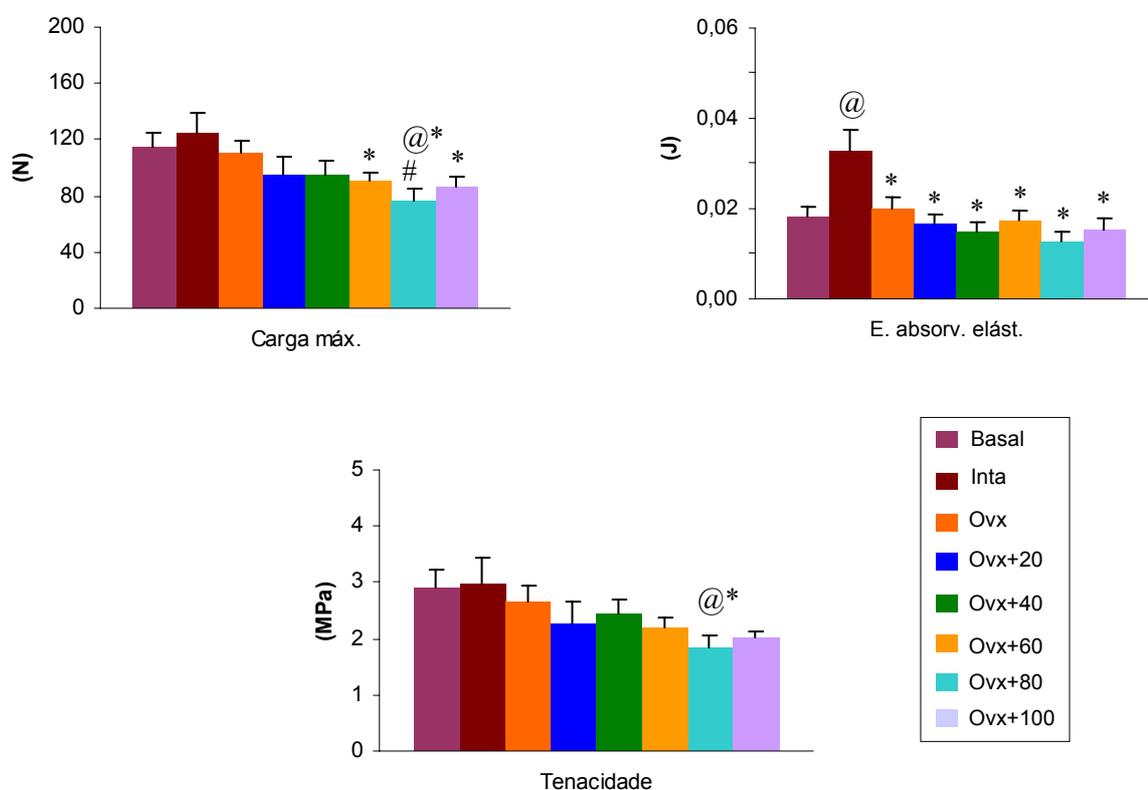
Comparando-se o grupo Intacto ao Basal, verificou-se um aumento da Energia absorvida na fase elástica. Os resultados também demonstraram que houve redução da Energia absorvida na fase elástica, quando se comparou o grupo Ovx ao grupo Intacto, bem como os demais parâmetros biomecânicos apresentaram-se reduzidos, apesar de não significativos.

O tratamento com flúor, nas diferentes concentrações, durante este período de ingestão, não impediu a redução da resistência mecânica do tecido ósseo induzida pela ovariectomia, de acordo com os parâmetros biomecânicos estudados.

Tabela 4 – Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros		
	Carga máxima (N)	E. absorv. Elást. (J)	Tenacidade (MPa)
Basal (9)	114,5 ± 10,1	0,0185 ± 0,0020	2,92 ± 0,31
Inta (8)	125,2 ± 13,1	0,0326 ± 0,0047@	2,98 ± 0,46
Ovx (10)	110,4 ± 8,3	0,0199 ± 0,0027*	2,66 ± 0,29
Ovx+20 (9)	94,6 ± 13,8	0,0164 ± 0,0024*	2,27 ± 0,39
Ovx+40 (7)	94,7 ± 10,9	0,0148 ± 0,0022*	2,45 ± 0,25
Ovx+60 (8)	90,1 ± 6,0*	0,0174 ± 0,0020*	2,19 ± 0,20
Ovx+80 (7)	77,0 ± 8,5@*#	0,0127 ± 0,0023*	1,85 ± 0,21@*
Ovx+100 (6)	86,2 ± 7,4*	0,0152 ± 0,0028*	2,02 ± 0,11

(n) Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx.

**Figura 7-** Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx.

Propriedades físicas do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 5 (parte I e II) e as Figuras 8, 9 e 10 apresentam os valores das propriedades físicas dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Os resultados demonstram que, no grupo Intacto, houve um aumento da maioria dos parâmetros físicos estudados, quando este grupo foi comparado ao Basal. Contudo, a redução contraditória da densidade mineral, observada no grupo Intacto, pode ser explicada pelo aumento do volume ósseo ocorrido neste grupo.

Comparando-se o grupo Ovx com o grupo Intacto, observou-se uma redução do peso imerso, peso úmido, peso seco, peso das cinzas e densidade óssea.

O tratamento com flúor, principalmente nas doses de 60, 80 e 100 ppm de NaF, promoveu um aumento das densidades óssea e mineral, bem como do percentual de material mineral; e ainda provocou redução do percentual ósseo de água, quando estes grupos foram comparados ao grupo Ovx.

Tabela 5 (parte I)– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).

Grupos	Parâmetros				
	Peso imerso (g)	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Peso cinzas (g)	Volume ósseo (cm ³)
Basal (9)	0,016 ± 0,001	0,058 ± 0,003	0,031 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,042 ± 0,002
Inta (8)	0,025 ± 0,001@	0,087 ± 0,003@	0,042 ± 0,001@	0,026 ± 0,001@	0,062 ± 0,003@
Ovx (10)	0,019 ± 0,001*	0,076 ± 0,004@*	0,035 ± 0,002*	0,023 ± 0,001*	0,057 ± 0,003@
Ovx+20 (9)	0,018 ± 0,002*	0,069 ± 0,005*	0,033 ± 0,003*	0,021 ± 0,002*	0,051 ± 0,004@*
Ovx+40 (7)	0,017 ± 0,002*	0,068 ± 0,005*	0,036 ± 0,003*	0,023 ± 0,002	0,052 ± 0,003@*
Ovx+60 (8)	0,020 ± 0,001@*	0,072 ± 0,002@*	0,037 ± 0,001@*	0,024 ± 0,001*#	0,052 ± 0,002@*
Ovx+80 (7)	0,018 ± 0,001*	0,065 ± 0,003*#	0,033 ± 0,002*	0,021 ± 0,001*c	0,047 ± 0,002*#
Ovx+100 (6)	0,021 ± 0,002@	0,073 ± 0,007	0,038 ± 0,003	0,025 ± 0,002	0,052 ± 0,005

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; c vs Ovx+60 ppm NaF.

Tabela 5 (parte II)– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento).

Grupos	Parâmetros				
	Dens. óssea (g/cm ³)	Dens. mineral (g/cm ³)	%Água	%Mat. orgânico	% Mat. mineral
Basal (9)	1,38 ± 0,021	0,49 ± 0,017	46,62 ± 0,96	17,55 ± 0,86	35,83 ± 1,19
Inta (8)	1,40 ± 0,010	0,43 ± 0,012@	52,18 ± 0,71@	17,44 ± 0,33	30,38 ± 0,68@
Ovx (10)	1,32 ± 0,009@*	0,39 ± 0,010@	53,69 ± 0,68@	16,59 ± 0,39	29,72 ± 0,59@
Ovx+20 (9)	1,34 ± 0,014*	0,41 ± 0,012@	52,89 ± 0,95@	16,33 ± 0,40	30,79 ± 0,79@
Ovx+40 (7)	1,31 ± 0,028*	0,45 ± 0,018#	47,19 ± 1,43*#a	18,89 ± 1,07a	33,93 ± 1,14*#a
Ovx+60 (8)	1,38 ± 0,015#b	0,47 ± 0,014*#a	49,08 ± 0,90*#a	17,09 ± 0,27	33,84 ± 0,74*#a
Ovx+80 (7)	1,38 ± 0,010#a	0,45 ± 0,009#a	49,88 ± 0,78@#a	17,58 ± 0,37	32,55 ± 0,50@*#
Ovx+100 (6)	1,41 ± 0,013#ab	0,49 ± 0,012*#ad	47,04 ± 1,04*#a	18,18 ± 0,63#a	34,78 ± 0,68*#ad

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, d vs Ovx+20, 40, 80 ppm NaF, respectivamente.

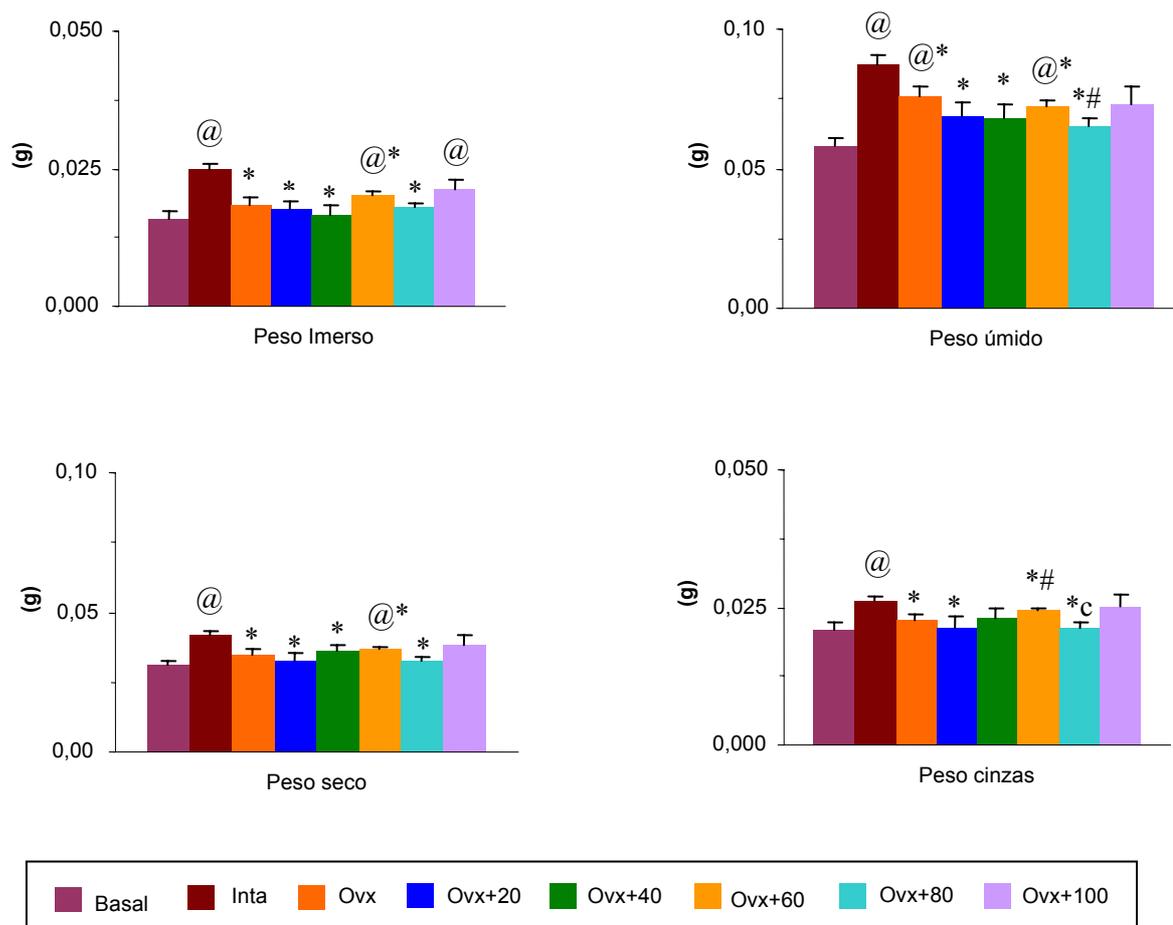


Figura 8– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento). Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; c vs Ovx+60 ppm NaF.

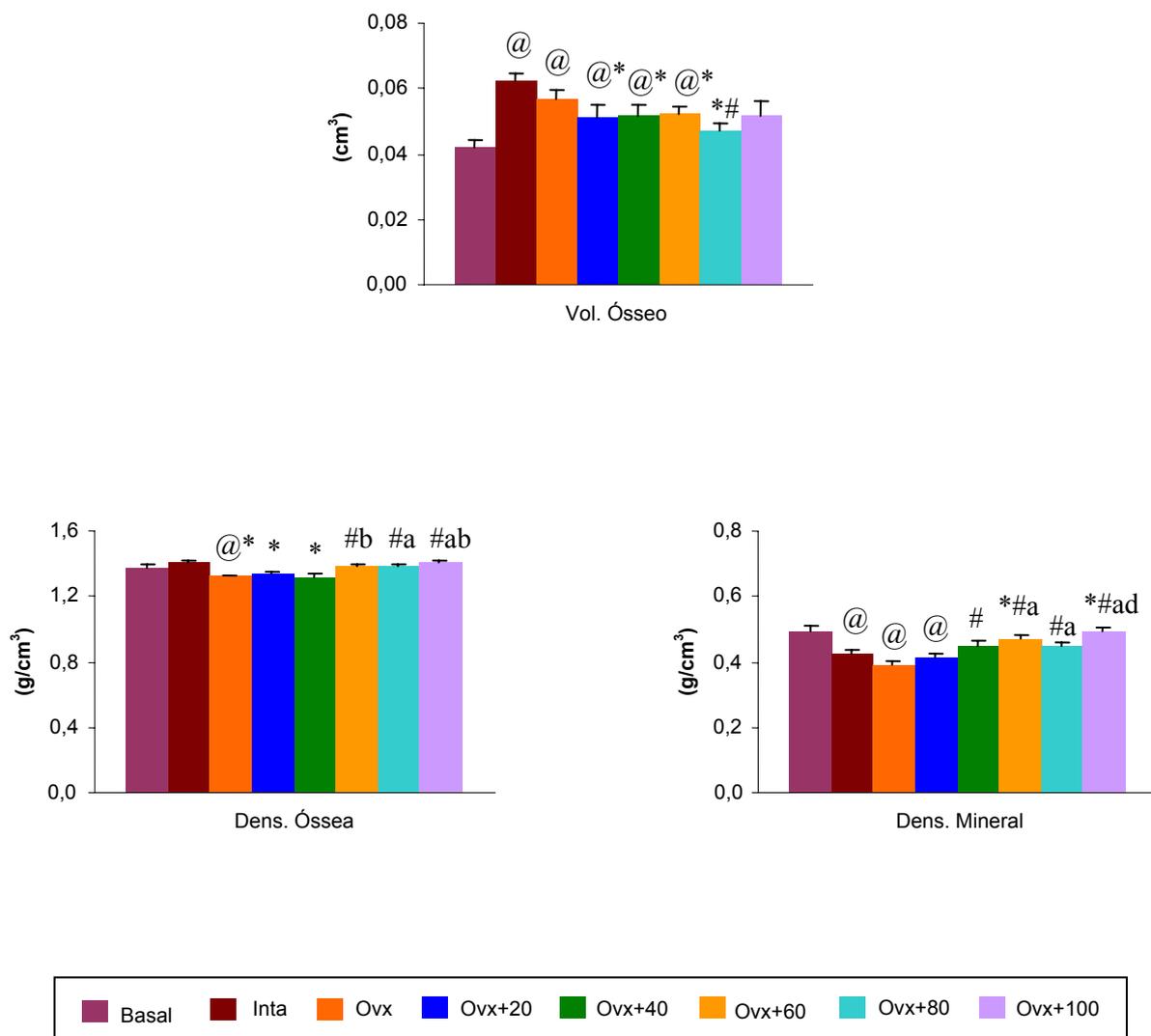


Figura 9- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, d vs Ovx+20, 40, 80 ppm NaF, respectivamente.

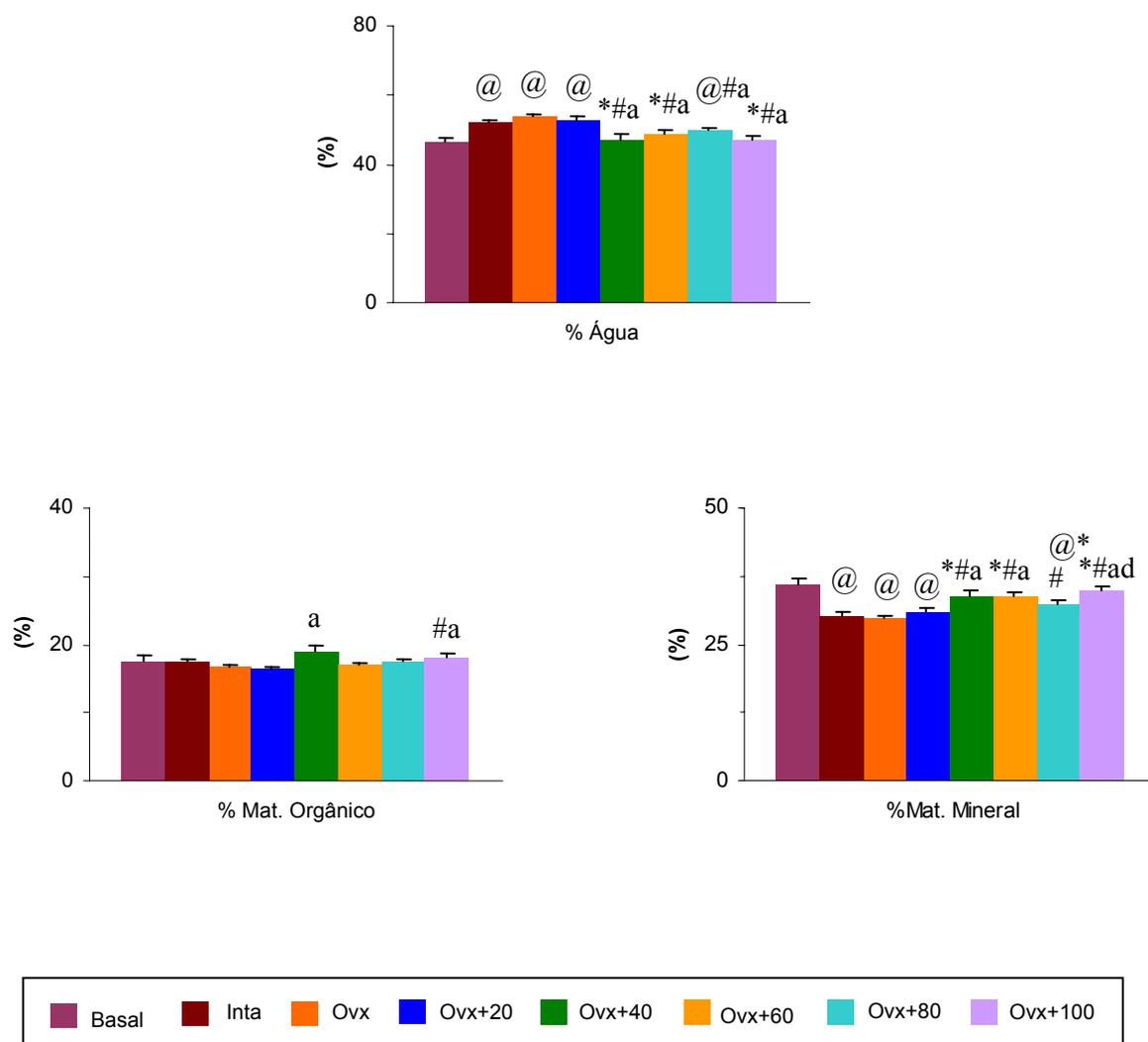


Figura 10- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (4 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, d vs Ovx+20, 80 ppm NaF, respectivamente.

3.2 Efeito do tratamento com diferentes concentrações de flúor, por um período de 6 meses, sobre a osteopenia induzida por ovariectomia em ratas.

Propriedades biométricas

A Tabela 6 e a Figura 11 apresentam os valores de peso corporal inicial e final, ganho de peso corporal e altura do corpo vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.

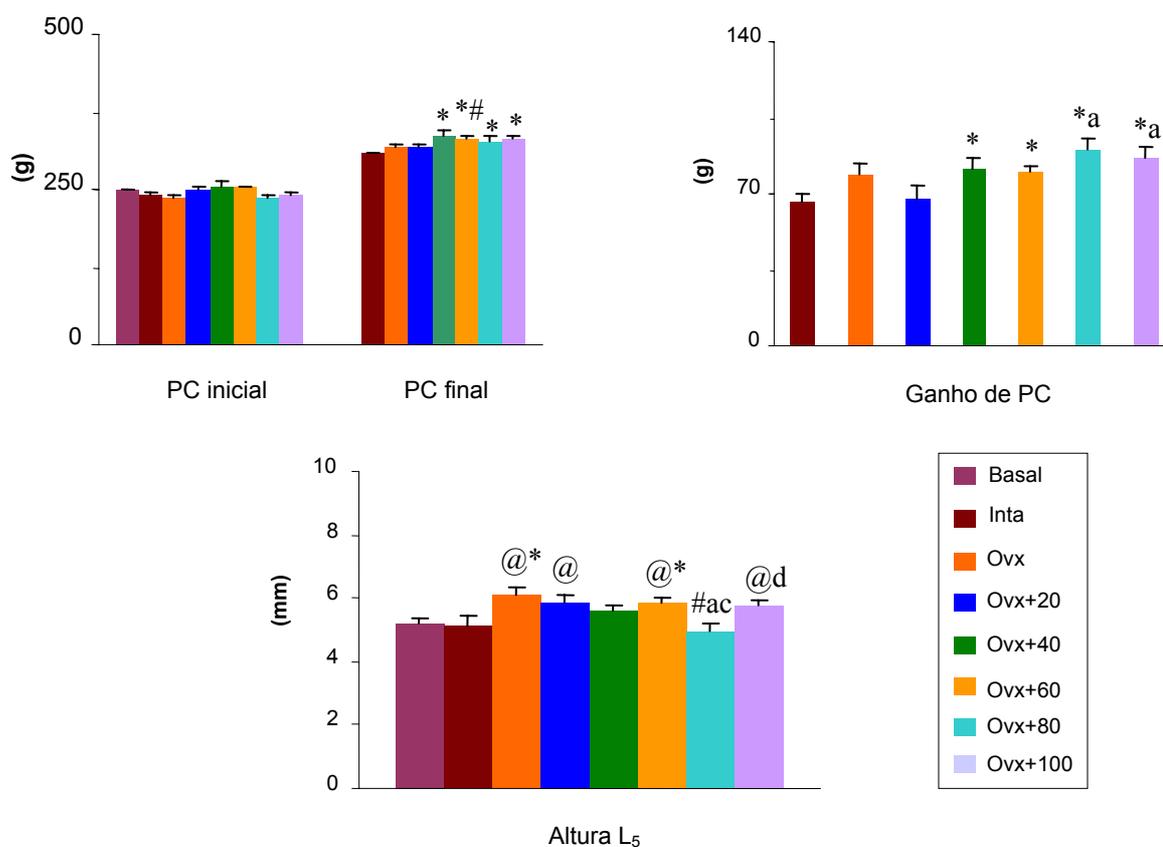
Os pesos corporais iniciais dos animais não diferiram entre os grupos. O ganho de peso corporal do grupo Ovx mostrou-se maior, apesar de não significativo, quando comparado ao grupo Intacto. Os grupos Ovx tratados com flúor, exceto a dose de 20 ppm de NaF, apresentaram um aumento do ganho de peso corporal em relação ao grupo Intacto e não foram diferentes do grupo Ovx para este parâmetro.

A altura do corpo vertebral foi maior nos grupos Ovx, Ovx+20, Ovx+60 e Ovx+100 ppm de NaF, quando comparados ao grupo Basal. Pôde-se observar que, surpreendentemente, o grupo Ovx evidenciou um aumento do parâmetro em questão, quando foi comparado ao grupo Intacto. Os grupos tratados com flúor, com exceção do grupo Ovx+60 ppm de NaF, apresentaram resultados semelhantes àqueles encontrados no grupo Intacto.

Tabela 6- Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros			
	PC inicial (g)	PC final (g)	Ganho de peso (g)	Altura vért. (mm)
Basal (9)	248,0 ± 3,77	_____	_____	5,24 ± 0,13
Inta (7)	240,1 ± 4,39	306,9 ± 3,73	66,7 ± 3,12	5,09 ± 0,32
Ovx (8)	237,9 ± 3,22	316,1 ± 5,59	78,3 ± 5,53	6,12 ± 0,24@*
Ovx+20 (9)	248,4 ± 4,48	316,2 ± 8,09	67,8 ± 5,78	5,87 ± 0,20@
Ovx+40 (6)	255,8 ± 6,65	336,8 ± 9,09*	81,0 ± 5,39*	5,62 ± 0,18
Ovx+60 (8)	253,1 ± 3,17	333,5 ± 4,42*#	80,4 ± 2,67*	5,89 ± 0,10@*
Ovx+80 (7)	236,9 ± 2,57	327,3 ± 6,87*	90,4 ± 5,52*a	4,98 ± 0,23#ac
Ovx+100 (7)	243,1 ± 3,81	329,7 ± 5,52*	86,6 ± 4,88*a	5,81 ± 0,13@d

(n) Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, c, d vs Ovx+20, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

**Figura 11-** Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, c, d vs Ovx+20, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades bioquímicas

Conteúdo de Flúor da tíbia direita

A Figura 12 mostra a relação entre a quantidade de flúor (ppm) encontrada na tíbia direita dos animais com a dose de flúor administrada, durante 6 meses de tratamento.

Verificou-se que as variáveis apresentaram uma relação linear entre si, pois com o aumento da dose de flúor fornecida aos animais, ocorreu um aumento proporcional da quantidade de flúor (ppm) encontrada na tíbia direita dos mesmos. O índice de correlação (r) foi 0,9524 e a equação representativa da reta, obtida por regressão linear, $y_2 = 508,63x - 202,34$.

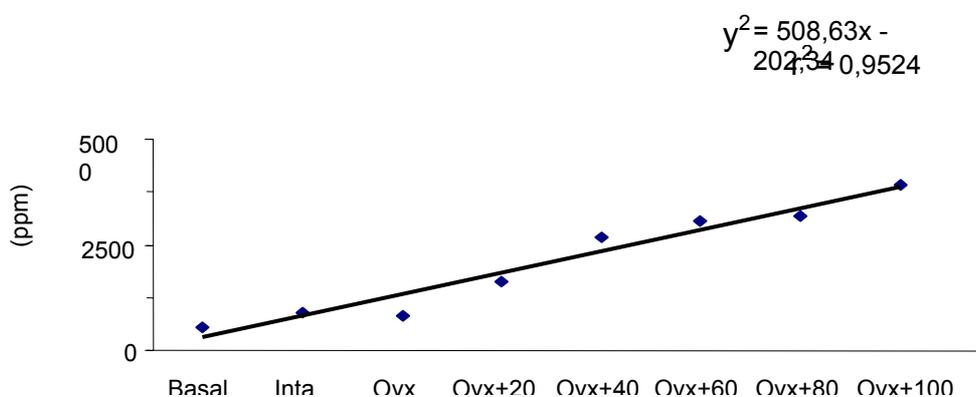


Figura 12 - Relação entre o conteúdo de flúor da tíbia direita das ratas com as concentrações de NaF fornecidas (6 meses de tratamento).

Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 7 e a Figura 13 apresentam os valores de conteúdo de cálcio e fósforo dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Os grupos Ovx+20, Ovx+40 e Ovx+60 ppm de NaF demonstraram um aumento do conteúdo de cálcio do corpo vertebral em relação ao grupo Basal, sendo que, nos dois últimos grupos, observou-se conjuntamente um aumento significativo do conteúdo de fósforo da vértebra.

O grupo Ovx, quando comparado ao grupo Intacto, apresentou resultados reduzidos dos conteúdos de cálcio e fósforo ósseos, todavia tais resultados não foram significativos.

O tratamento com flúor na dose de 60 ppm de NaF promoveu um aumento do conteúdo de cálcio da vértebra, quando comparado ao grupo Ovx; já em relação ao conteúdo de fósforo ósseo, todas as doses, exceto 80 ppm de NaF, preveniram a redução deste parâmetro induzida pela ovariectomia.

Tabela 7– Conteúdos de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros	
	Cálcio (mg/vért.)	Fósforo (mg/vért.)
Basal (9)	6,55 ± 0,52	3,57 ± 0,21
Inta (7)	7,78 ± 0,71	3,57 ± 0,32
Ovx (8)	6,94 ± 0,33	3,34 ± 0,15
Ovx+20 (9)	8,20 ± 0,48@	3,83 ± 0,18#
Ovx+40 (6)	8,30 ± 0,58@	4,37 ± 0,24@#
Ovx+60 (8)	9,13 ± 0,57@#	4,71 ± 0,28@*#a
Ovx+80 (7)	6,32 ± 0,28abc	3,27 ± 0,11abc
Ovx+100 (7)	8,02 ± 0,45d	4,15 ± 0,22#d

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

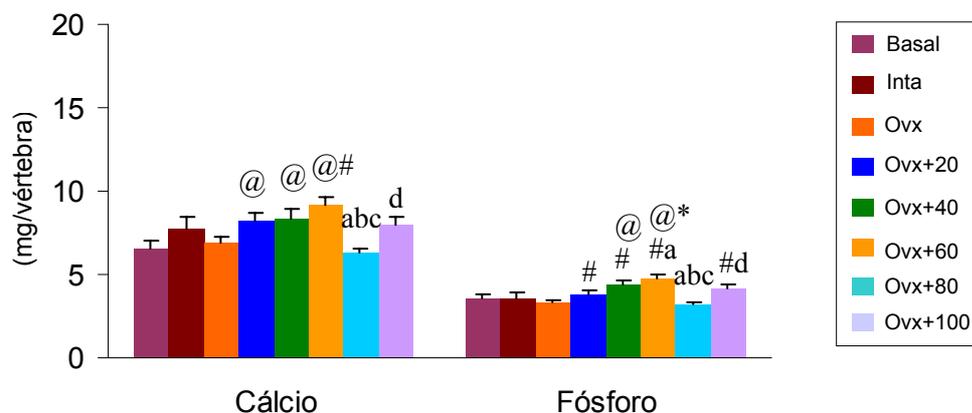


Figura 13– Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades biomecânicas do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 8 e a Figura 14 apresentam os valores dos parâmetros biomecânicos dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos com o teste de compressão.

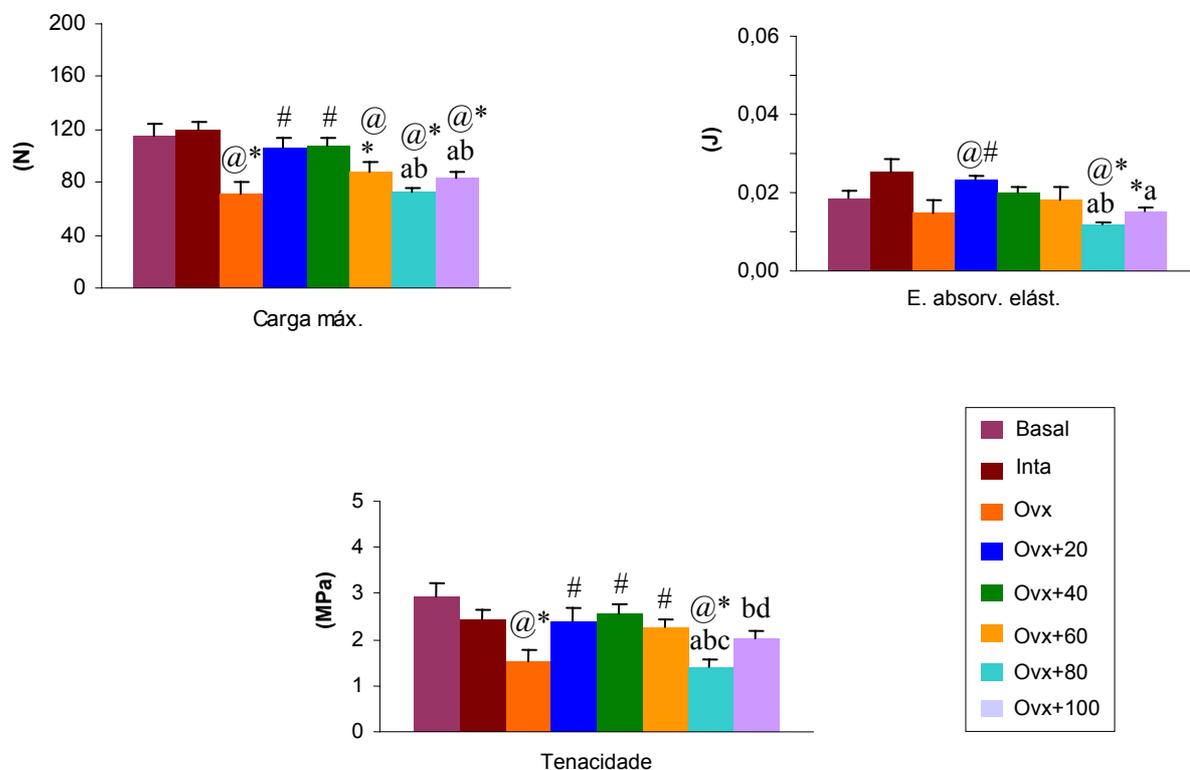
O grupo Intacto não foi diferente do grupo Basal para todos os parâmetros biomecânicos analisados.

O grupo Ovx mostrou uma redução dos valores dos parâmetros carga máxima e tenacidade, quando comparado aos grupos Intacto e Basal. A suplementação com flúor, nas doses de 20 e 40 ppm de NaF, promoveu um aumento significativo da carga máxima e tenacidade, quando tais grupos foram comparados ao grupo Ovx.

Tabela 8– Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros		
	Carga máxima (N)	E. absorv. Elást. (J)	Tenacidade (MPa)
Basal (9)	114,5 ± 10,1	0,0185 ± 0,0020	2,92 ± 0,31
Inta (7)	119,5 ± 6,3	0,0252 ± 0,0035	2,45 ± 0,19
Ovx (8)	71,9 ± 8,4@*	0,0147 ± 0,0032	1,52 ± 0,25@*
Ovx+20 (9)	106,2 ± 7,4#	0,0231 ± 0,0012@#	2,41 ± 0,26#
Ovx+40 (6)	107,2 ± 6,9#	0,0199 ± 0,0017	2,58 ± 0,18#
Ovx+60 (8)	88,2 ± 7,4@*	0,0182 ± 0,0031	2,27 ± 0,18#
Ovx+80 (7)	73,3 ± 2,7@*ab	0,0118 ± 0,0008@*ab	1,40 ± 0,16@*abc
Ovx+100 (7)	84,0 ± 4,1@*ab	0,0151 ± 0,0011*a	2,02 ± 0,15bd

(n) Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

**Figura 14**– Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades físicas do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 9 (parte I e II) e as Figuras 15, 16 e 17 apresentam os valores das propriedades físicas dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

O grupo Intacto não apresentou diferença em nenhum dos parâmetros físicos mensurados, quando foi comparado ao grupo Basal. O grupo Ovx exibiu um aumento do peso úmido, volume ósseo e percentual ósseo de água em relação ao grupo Basal; em contrapartida, apresentou uma redução da densidade mineral e percentual de material mineral, quando comparado a este grupo.

Comparando-se o grupo Ovx ao grupo Intacto, pôde-se observar aumento do volume ósseo e uma redução das densidades óssea e mineral, do percentual de material mineral e aumento compensatório do percentual ósseo de água.

Os grupos Ovx+40 e Ovx+60 ppm de NaF apresentaram um aumento do peso imerso, peso seco, peso das cinzas, densidade óssea, densidade mineral e percentuais de material orgânico e mineral e redução do percentual ósseo de água em relação ao grupo Ovx. Ressalta-se que o grupo Ovx+60 ppm de NaF exibiu um aumento do peso imerso, peso úmido, peso seco e volume ósseo, quando foi comparado ao grupo Intacto.

Tabela 9 (parte I)– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).

Grupos	Parâmetros				
	Peso imerso (g)	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Peso cinzas (g)	Volume ósseo (cm ³)
Basal (9)	0,016 ± 0,001	0,058 ± 0,003	0,031 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,042 ± 0,002
Inta (7)	0,018 ± 0,002	0,061 ± 0,007	0,032 ± 0,003	0,021 ± 0,002	0,043 ± 0,005
Ovx (8)	0,018 ± 0,001	0,076 ± 0,004@	0,034 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,057 ± 0,003@*
Ovx+20 (9)	0,020 ± 0,001@	0,078 ± 0,005@	0,037 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,057 ± 0,004@*
Ovx+40 (6)	0,022 ± 0,001@#	0,079 ± 0,003@	0,039 ± 0,002@#	0,025 ± 0,001@#	0,057 ± 0,002@
Ovx+60 (8)	0,024 ± 0,001@*#	0,085 ± 0,004@*	0,042 ± 0,002@*#	0,026 ± 0,002@#	0,061 ± 0,003@*
Ovx+80 (7)	0,015 ± 0,0004#abc	0,059 ± 0,003#abc	0,029 ± 0,001#abc	0,018 ± 0,001abc	0,044 ± 0,003#abc
Ovx+100 (7)	0,019 ± 0,001@cd	0,075 ± 0,003@d	0,036 ± 0,002d	0,023 ± 0,001d	0,055 ± 0,002@d

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

Tabela 9 (parte II)– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento).

Grupos	Parâmetros				
	Dens. óssea (g/cm ³)	Dens. mineral (g/cm ³)	%Água	%Mat. orgânico	% Mat. mineral
Basal (9)	1,38 ± 0,021	0,49 ± 0,017	46,62 ± 0,96	17,55 ± 0,86	35,83 ± 1,19
Inta (7)	1,42 ± 0,017	0,50 ± 0,017	47,12 ± 0,80	17,72 ± 0,35	35,16 ± 0,92
Ovx (8)	1,32 ± 0,0178*	0,36 ± 0,011@*	55,73 ± 0,83@*	17,03 ± 0,52	27,24 ± 0,53@*
Ovx+20 (9)	1,36 ± 0,014*	0,41 ± 0,009@*#	52,89 ± 0,43@*#	16,93 ± 0,61	30,18 ± 0,54@*#
Ovx+40 (6)	1,38 ± 0,012#	0,44 ± 0,010@*#	50,36 ± 1,47#a	17,95 ± 1,19#	31,69 ± 0,56@*#
Ovx+60 (8)	1,39 ± 0,011#	0,43 ± 0,013@*#	51,24 ± 0,70@*#a	18,21 ± 0,34#	30,55 ± 0,79@*#
Ovx+80 (7)	1,34 ± 0,011*c	0,42 ± 0,013@*#	50,73 ± 1,07@*#	17,94 ± 0,67	31,34 ± 0,77@*#
Ovx+100 (7)	1,35 ± 0,001*c	0,41 ± 0,013@*#	51,27 ± 1,23@*#	18,16 ± 0,47	30,58 ± 0,90@*#

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, c vs Ovx+20, 60 ppm NaF, respectivamente.

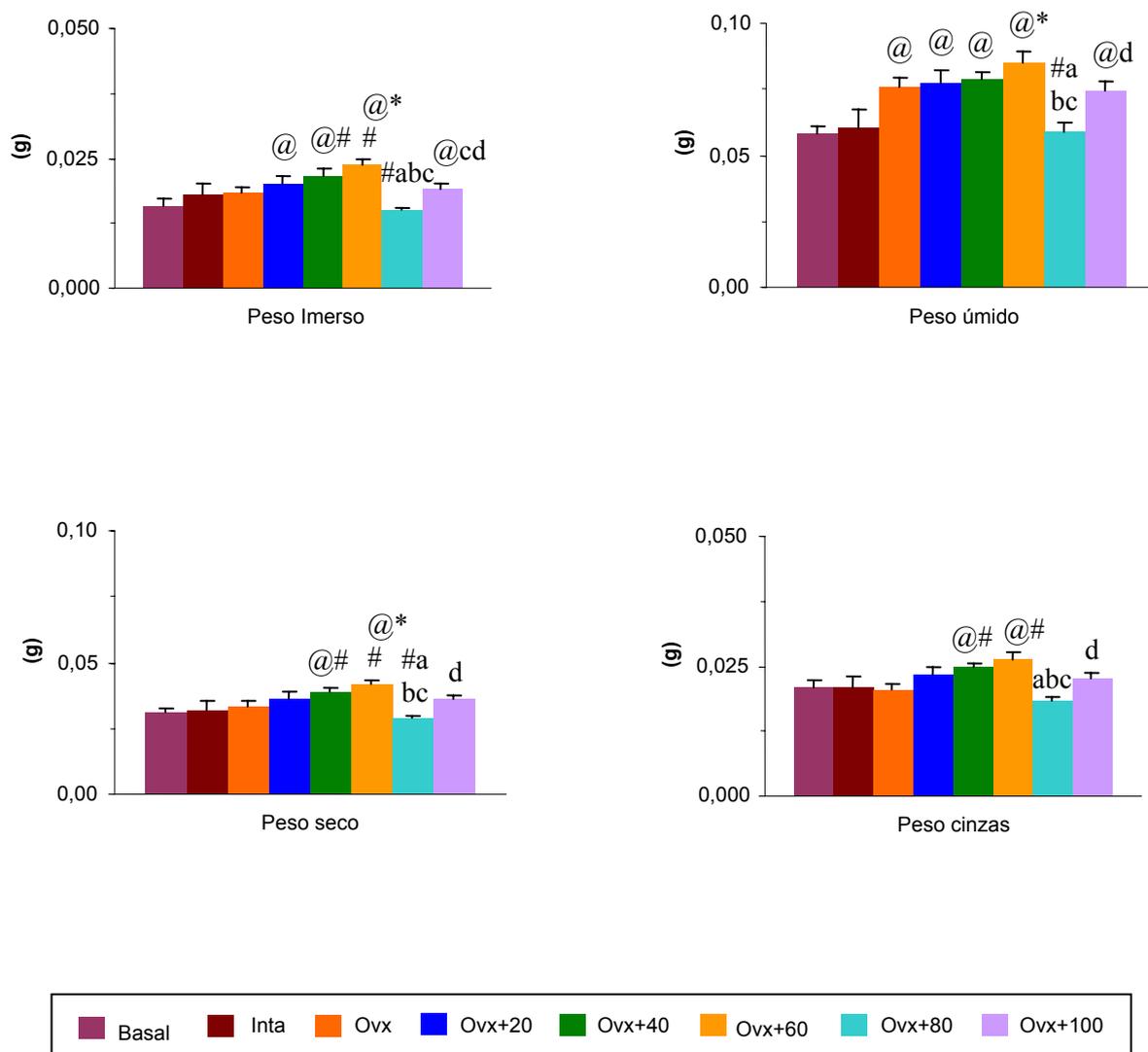


Figura 15- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

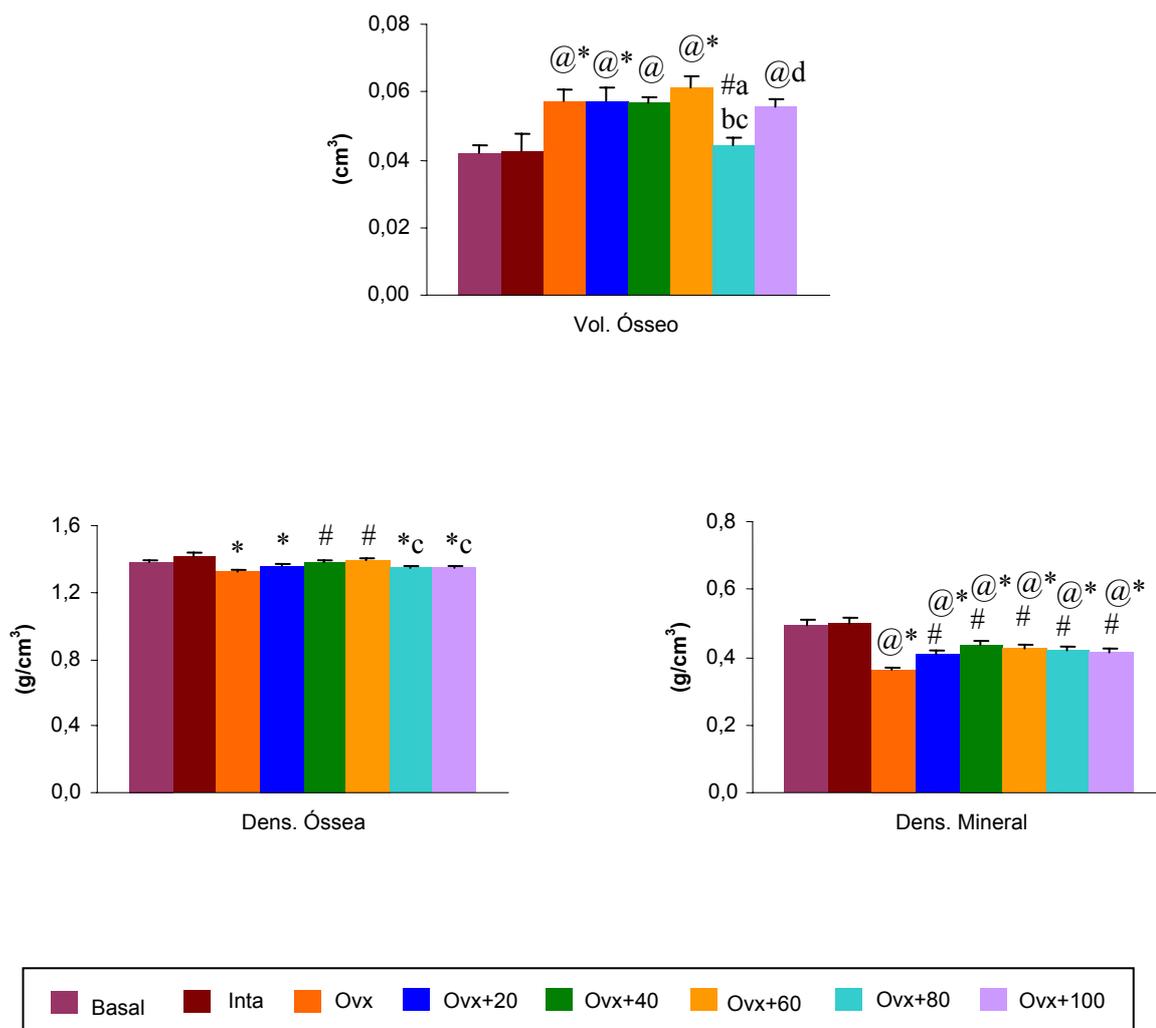


Figura 16- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

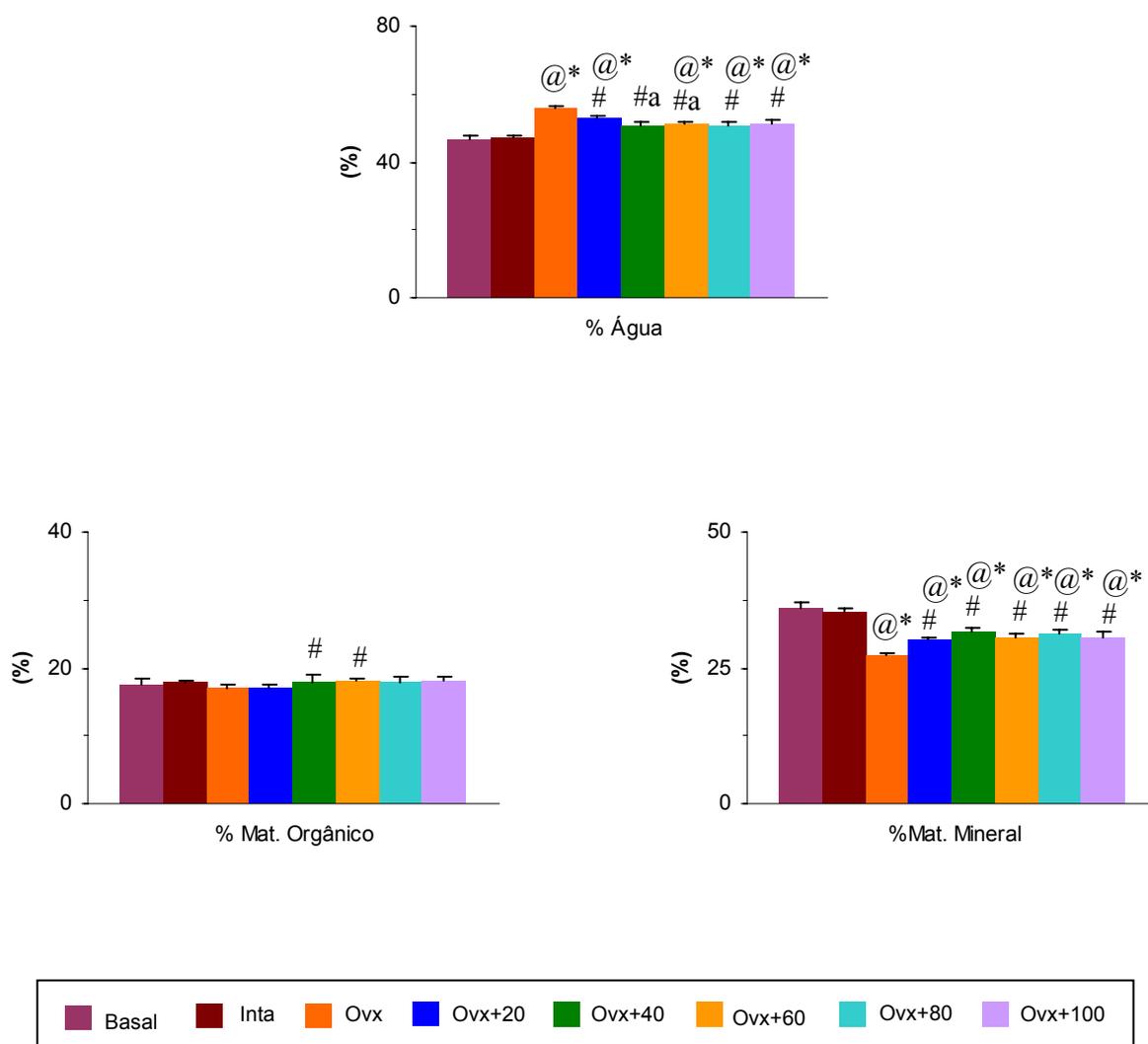


Figura 17- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (6 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a vs Ovx+20 ppm NaF.

3.3 Efeito do tratamento com diferentes concentrações de flúor, por um período de 8 meses, sobre a osteopenia induzida por ovariectomia em ratas.

Propriedades biométricas

A Tabela 10 e a Figura 18 exibem os valores de peso corporal inicial e final, ganho de peso corporal e altura do corpo vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Os pesos corporais iniciais dos animais não diferiram entre os grupos. Comparando-se o grupo Ovx com o grupo Intacto, observou-se um aumento do ganho de peso corporal das ratas ovariectomizadas.

Os grupos tratados com flúor, nas doses de 20, 80 e 100 ppm de NaF exibiram um aumento deste parâmetro em relação ao grupo Intacto, sendo que as duas últimas doses promoveram um ganho de peso corporal superior àquele observado para o grupo Ovx. Os grupos Ovx+40 e Ovx+60 ppm de NaF apresentaram valores aumentados de ganho de peso corporal em relação ao grupo Intacto, porém, estes não foram significativos.

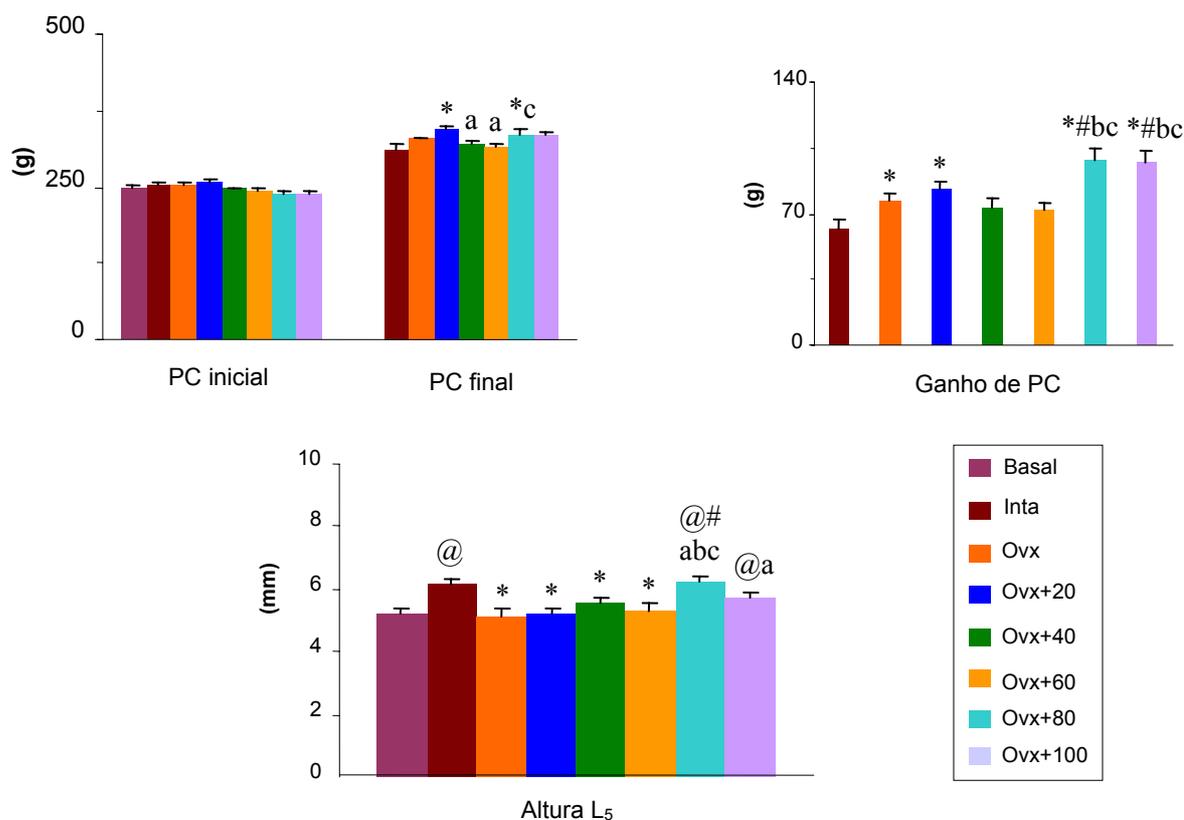
A altura do corpo vertebral dos animais pertencentes aos grupos Intacto, Ovx+80 e Ovx+100 ppm de NaF apresentou-se maior, quando estes foram comparados ao grupo Basal. Ocorreu uma redução da altura do corpo vertebral dos animais do grupo Ovx em relação ao grupo Intacto.

Os grupos Ovx+20, Ovx+40 e Ovx+60 ppm de NaF apresentaram redução da altura do corpo vertebral dos animais, quando foram comparados ao grupo Intacto; não diferindo do grupo Ovx. Os grupos Ovx+80 e Ovx+100 ppm de NaF não foram diferentes do grupo Intacto para o parâmetro em questão.

Tabela 10- Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros			
	PC inicial (g)	PC final (g)	Ganho de peso (g)	Altura vért. (mm)
Basal (9)	248,0 ± 3,77	—————	—————	5,24 ± 0,13
Inta (10)	250,4 ± 4,49	312,5 ± 7,32	62,1 ± 4,19	6,19 ± 0,12@
Ovx (8)	251,3 ± 6,03	328,4 ± 3,31	77,1 ± 3,53*	5,16 ± 0,23*
Ovx+20 (7)	259,4 ± 2,32	342,4 ± 5,11*	83,0 ± 4,53*	5,23 ± 0,15*
Ovx+40 (10)	245,4 ± 4,30	318,2 ± 8,15a	72,8 ± 5,12	5,53 ± 0,19*
Ovx+60 (8)	243,1 ± 2,82	314,6 ± 5,71a	71,5 ± 3,86	5,26 ± 0,27*
Ovx+80 (6)	238,2 ± 6,64	337,2 ± 6,91*c	99,0 ± 5,47*#bc	6,23 ± 0,16@#abc
Ovx+100 (6)	239,7 ± 3,66	336,5 ± 5,63	96,8 ± 6,57*#bc	5,73 ± 0,17@a

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c vs Ovx+20, 40, 60 ppm NaF, respectivamente.

**Figura 18-** Parâmetros biométricos das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento). Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c vs Ovx+20, 40, 60 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades bioquímicas

Conteúdo de Flúor da tíbia direita

A Figura 19 mostra a relação entre a quantidade de flúor (ppm) encontrada na tíbia direita dos animais com as concentrações de flúor administradas.

Observou-se uma relação linear entre as variáveis, pois, aumentando a concentração de flúor fornecida aos animais, ocorreu um aumento proporcional da quantidade deste mineral mensurada no tecido ósseo. O índice de correlação (r) foi 0,9588. Também foi obtida, através de regressão linear, a equação representativa da reta, $y_3 = 507,77 x - 228,74$.

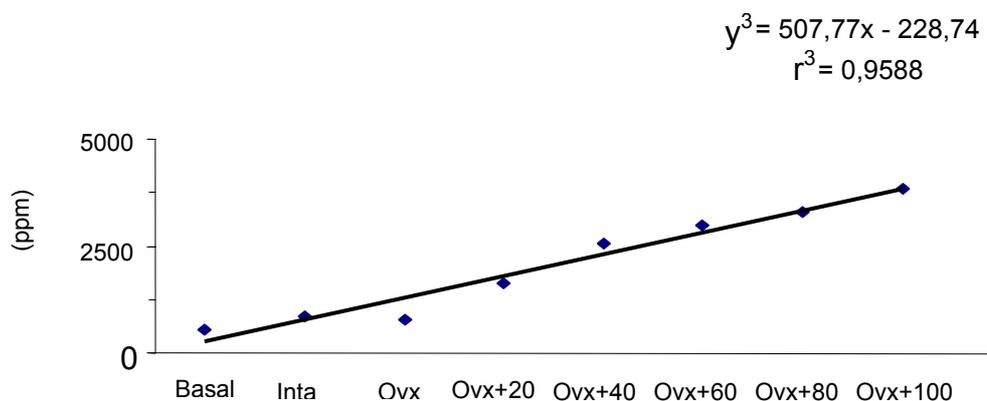


Figura 19- Relação entre o conteúdo de flúor da tíbia direita das ratas com as concentrações de NaF fornecidas (8 meses de tratamento).

Conteúdo de Cálcio e Fósforo de corpo vertebral (L₅)

A Tabela 11 e a Figura 20 apresentam os valores de conteúdo de cálcio e fósforo dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Estes dados mostram que o grupo Intacto apresentou um aumento dos conteúdos de cálcio e fósforo do corpo vertebral em relação ao grupo Basal. O grupo Ovx evidenciou uma redução destes parâmetros bioquímicos, quando comparado ao grupo Intacto.

Os grupos de animais que receberam as dosagens de 20, 80 e 100 ppm de NaF, exibiram valores aumentados de conteúdo de cálcio do corpo vertebral em relação ao grupo Ovx, contudo tais resultados não foram significativos. Com relação ao conteúdo de fósforo ósseo, não houve diferença entre os grupos tratados com flúor e o grupo Ovx.

Tabela 11– Conteúdos de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros	
	Cálcio (mg/vért.)	Fósforo (mg/vért.)
Basal (9)	6,55 ± 0,52	3,57 ± 0,21
Inta (10)	9,55 ± 0,55@	4,89 ± 0,27@
Ovx (8)	7,72 ± 0,70 *	3,78 ± 0,38*
Ovx+20 (7)	8,52 ± 0,48@	4,18 ± 0,24
Ovx+40 (10)	7,44 ± 0,52*	3,78 ± 0,23*
Ovx+60 (8)	7,84 ± 0,75	3,77 ± 0,27*
Ovx+80 (6)	9,41 ± 0,89@	4,41 ± 0,41
Ovx+100 (6)	8,57 ± 0,60@	3,94 ± 0,25*

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs. Basal; * vs Intacto.

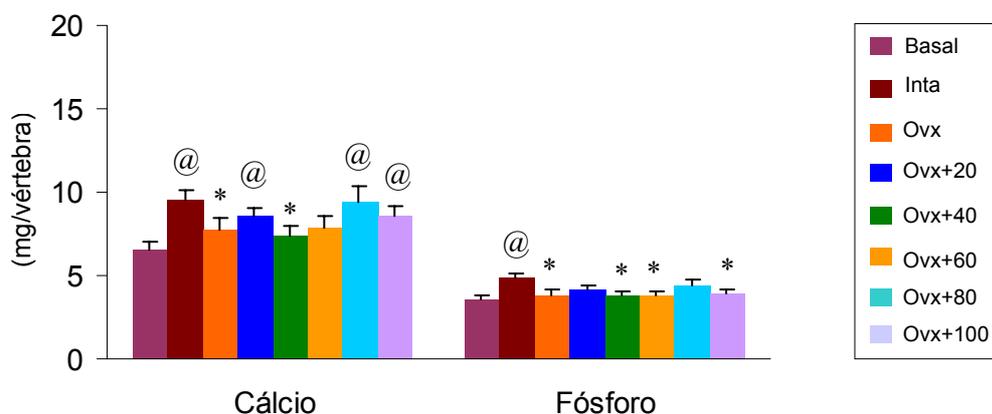


Figura 20– Conteúdo de Cálcio e Fósforo do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto.

Propriedades biomecânicas do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 12 e a Figura 21 apresentam os valores dos parâmetros biomecânicos dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

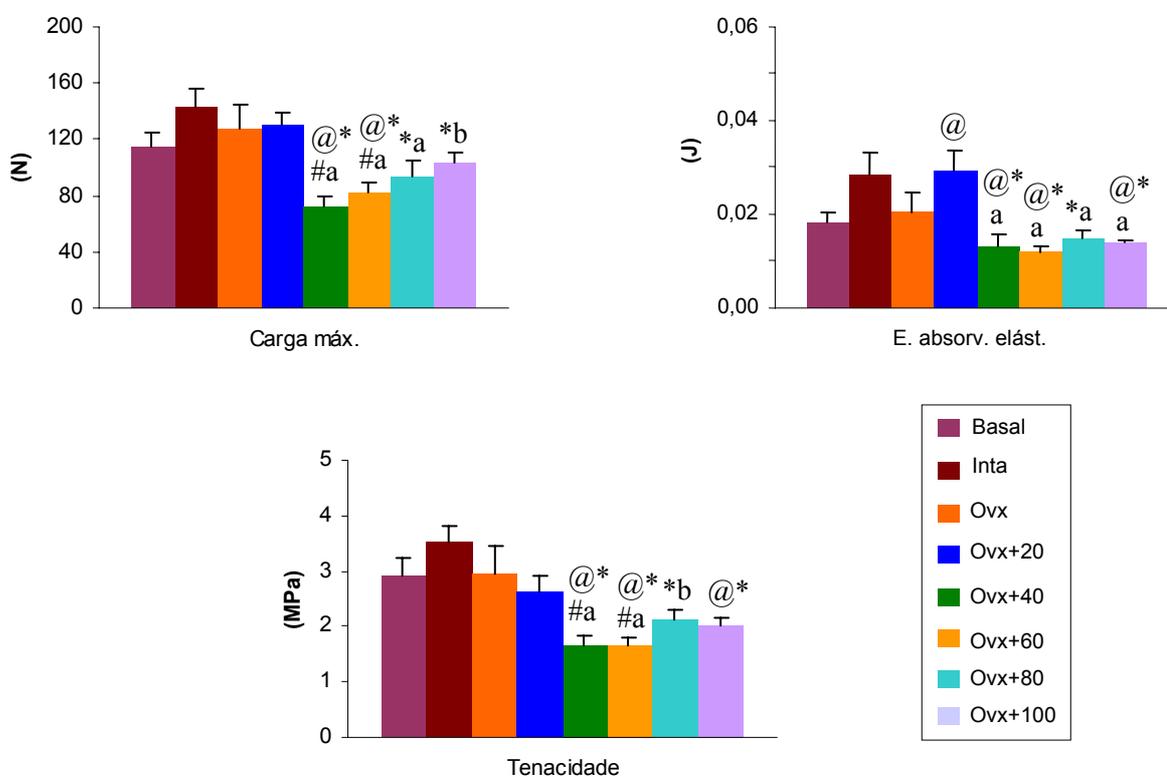
Quando comparado ao grupo Basal, o grupo Intacto apresentou valores maiores, apesar de não significativos, em todos os parâmetros biomecânicos analisados. O grupo Ovx exibiu uma redução dos valores de carga máxima, energia absorvida na fase elástica e tenacidade, comparado ao grupo Intacto; esta redução apesar de não ter sido significativa, evidencia o efeito deletério da ovariectomia sobre a resistência mecânica dos ossos.

Apenas a dose de 20 ppm de NaF provocou uma tendência a valores maiores de carga máxima e energia absorvida na fase elástica. Os grupos Ovx+80 e Ovx+100 ppm de NaF não diferiram do grupo Ovx para todos os parâmetros biomecânicos estudados. As doses de 40 e 60 ppm de NaF promoveram redução da carga máxima e tenacidade em relação ao grupo Ovx.

Tabela 12– Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).

Grupos experimentais	Parâmetros		
	Carga máxima (N)	E. absorv. Elást. (J)	Tenacidade (MPa)
Basal (9)	114,5 ± 10,1	0,0185 ± 0,0020	2,92 ± 0,31
Inta (10)	143,9 ± 11,5	0,0287 ± 0,0044	3,51 ± 0,32
Ovx (8)	127,2 ± 16,8	0,0203 ± 0,0045	2,95 ± 0,52
Ovx+20 (7)	130,4 ± 7,9	0,0293 ± 0,0044@	2,62 ± 0,30
Ovx+40 (10)	71,9 ± 7,6@*#a	0,0130 ± 0,0026@*a	1,65 ± 0,17@*#a
Ovx+60 (8)	82,2 ± 7,4@*#a	0,0118 ± 0,0016@*a	1,64 ± 0,15@*#a
Ovx+80 (6)	94,3 ± 10,5*a	0,0147 ± 0,0019*a	2,14 ± 0,16*b
Ovx+100 (6)	103,5 ± 7,3*b	0,0139 ± 0,0006@*a	2,01 ± 0,16@*

(n) Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b vs Ovx+20, 40 ppm NaF, respectivamente.

**Figura 21**– Parâmetros biomecânicos do corpo vertebral das ratas animais dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b vs Ovx+20, 40 ppm NaF, respectivamente.

Propriedades físicas do corpo vertebral (L₅)

A Tabela 13 (parte I e II) e as Figuras 22, 23 e 24 apresentam os valores das propriedades físicas dos corpos vertebrais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Quando comparado ao grupo Basal, o grupo Intacto exibiu um aumento do peso úmido, peso seco, peso das cinzas e volume ósseo. Este aumento do volume ósseo levou à redução das densidades óssea e mineral observada neste grupo.

O grupo Ovx obteve uma redução do peso das cinzas, comparado ao grupo Intacto, e evidenciou valores menores dos demais parâmetros físicos (exceto percentuais ósseos de água e de material orgânico), porém essa redução não foi significativa.

Comparando-se os grupos que receberam as diferentes doses de flúor com o grupo Ovx, verifica-se que as maiores concentrações (60, 80 e 100 ppm de NaF) aumentaram alguns parâmetros físicos, especialmente o peso imerso, densidades óssea e mineral e percentual de material mineral.

Tabela 13 (parte I)– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).

Grupos	Parâmetros				
	Peso imerso (g)	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Peso cinzas (g)	Volume ósseo (cm ³)
Basal (9)	0,016 ± 0,001	0,058 ± 0,003	0,031 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,042 ± 0,002
Inta (10)	0,019 ± 0,001	0,083 ± 0,004@	0,042 ± 0,002@	0,027 ± 0,001@	0,064 ± 0,002@
Ovx (8)	0,013 ± 0,002	0,067 ± 0,007	0,034 ± 0,003	0,021 ± 0,002*	0,055 ± 0,005@
Ovx+20 (7)	0,015 ± 0,001	0,072 ± 0,004@	0,036 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,057 ± 0,003@
Ovx+40 (10)	0,018 ± 0,001	0,072 ± 0,004@	0,035 ± 0,002*	0,021 ± 0,001*	0,054 ± 0,003@*
Ovx+60 (8)	0,019 ± 0,001#a	0,067 ± 0,002@*	0,032 ± 0,001*	0,021 ± 0,001*	0,048 ± 0,002@*a
Ovx+80 (6)	0,024 ± 0,001@*#abc	0,083 ± 0,004@c	0,041 ± 0,003@c	0,027 ± 0,001@bc	0,060 ± 0,003@c
Ovx+100 (6)	0,018 ± 0,002	0,067 ± 0,005*	0,037 ± 0,002	0,023 ± 0,002	0,049 ± 0,003*d

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

Tabela 13 (parte II)– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento).

Grupos	Parâmetros				
	Dens. óssea (g/cm ³)	Dens. mineral (g/cm ³)	%Água	%Mat. orgânico	% Mat. mineral
Basal (9)	1,38 ± 0,021	0,493 ± 0,017	46,62 ± 0,96	17,55 ± 0,86	35,83 ± 1,19
Inta (10)	1,29 ± 0,013@	0,415 ± 0,010@	48,65 ± 0,41	19,11 ± 0,47	32,32 ± 0,48@
Ovx (8)	1,22 ± 0,026@	0,379 ± 0,014@	49,33 ± 1,51	19,72 ± 0,75	30,95 ± 0,96@
Ovx+20 (7)	1,26 ± 0,009@	0,408 ± 0,013@	49,39 ± 0,97@	18,26 ± 0,33	32,35 ± 0,85@
Ovx+40 (10)	1,34 ± 0,016*#a	0,393 ± 0,009@	51,65 ± 0,81@*	18,99 ± 0,58	29,36 ± 0,46@*a
Ovx+60 (8)	1,39 ± 0,011*#ab	0,428 ± 0,011@#b	51,94 ± 1,02@*	17,17 ± 0,73	30,90 ± 0,77@
Ovx+80 (6)	1,40 ± 0,012*#ab	0,450 ± 0,013*#b	50,30 ± 0,92@	17,46 ± 0,68	32,23 ± 0,64@b
Ovx+100 (6)	1,38 ± 0,023*#a	0,483 ± 0,010*#abcd	44,85 ± 1,57*abcd	19,99 ± 0,93c	35,16 ± 0,69*#abcd

(n) Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

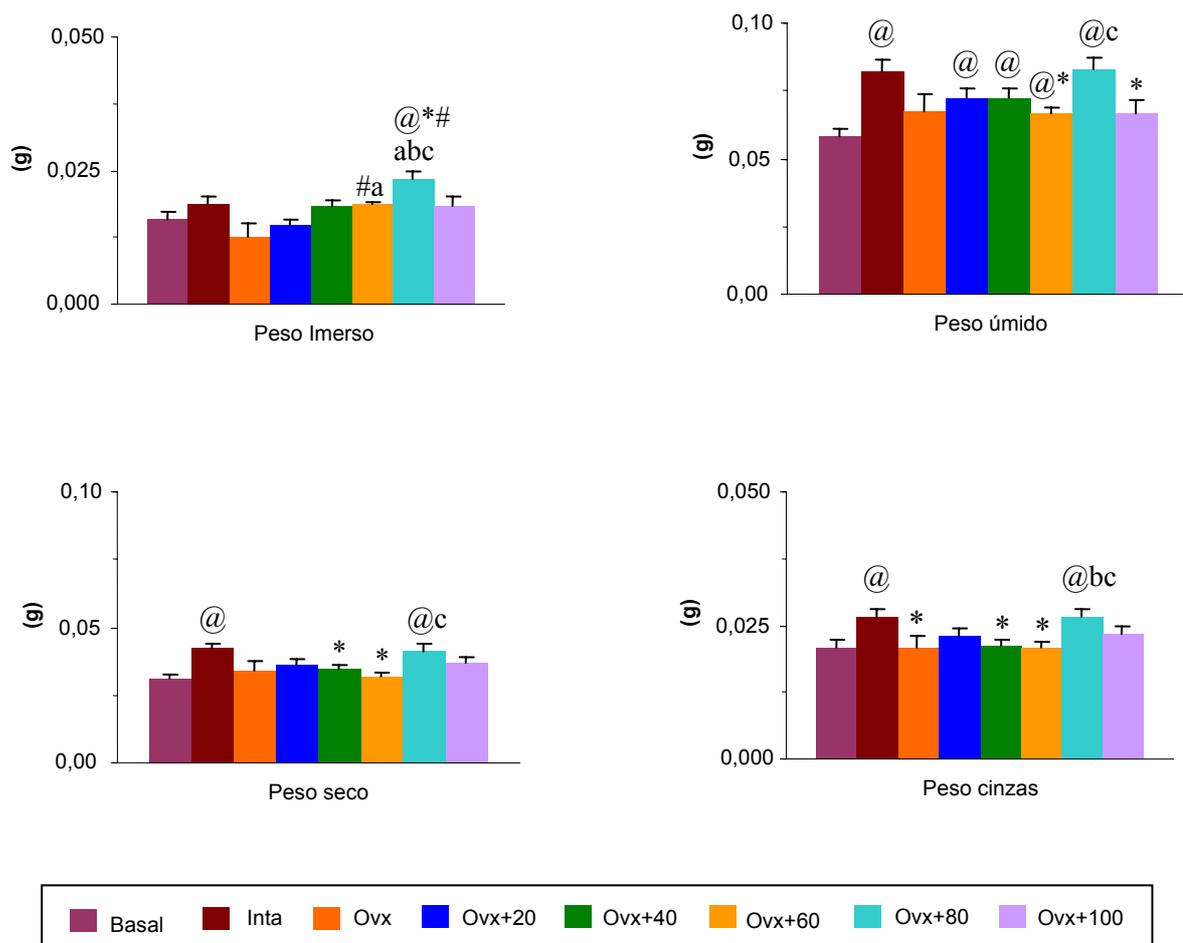


Figura 22– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento). Média ± EPM. p<0,05: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c vs Ovx+20, 40, 60 ppm NaF, respectivamente.

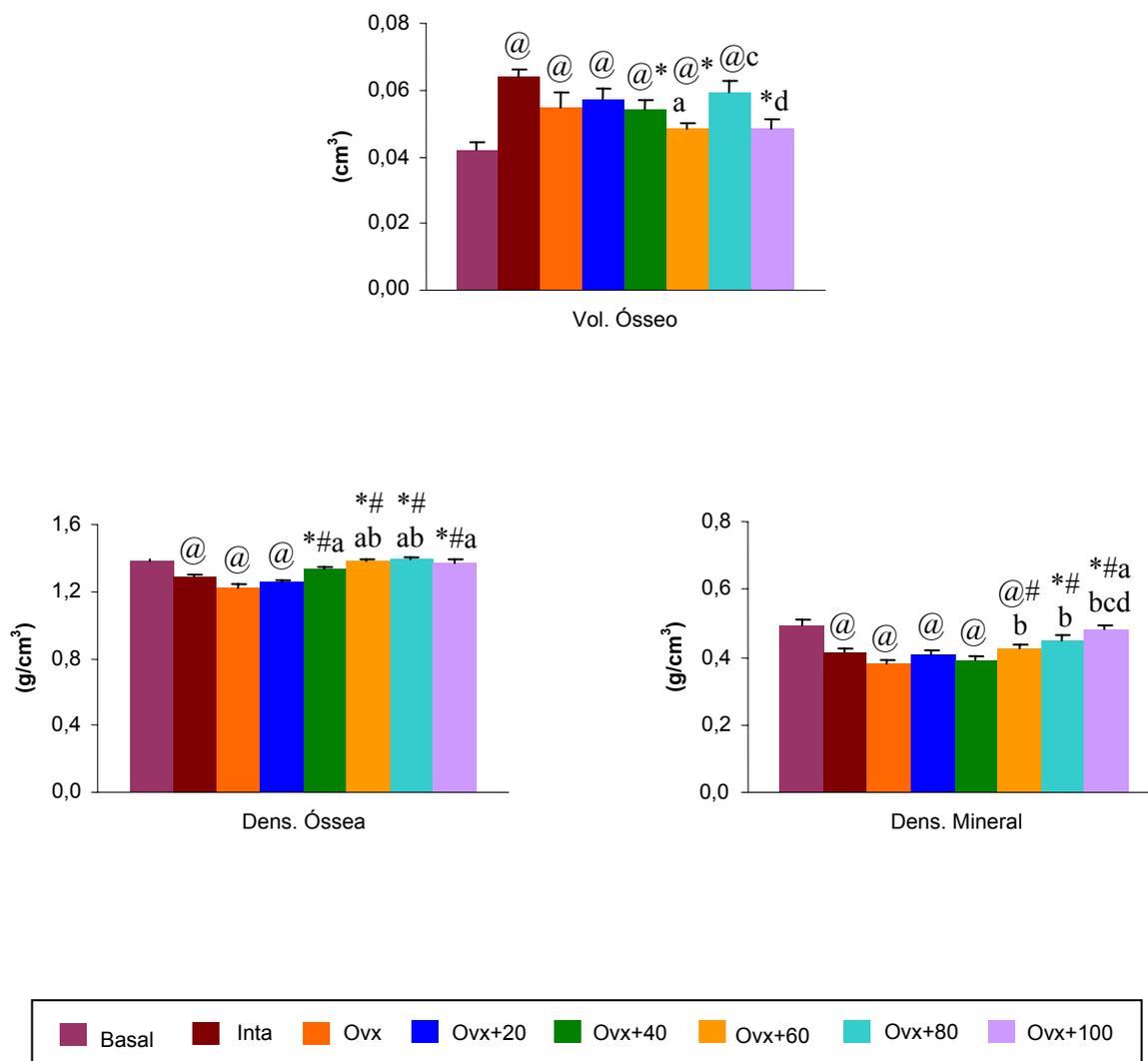


Figura 23– Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento). Média ± EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

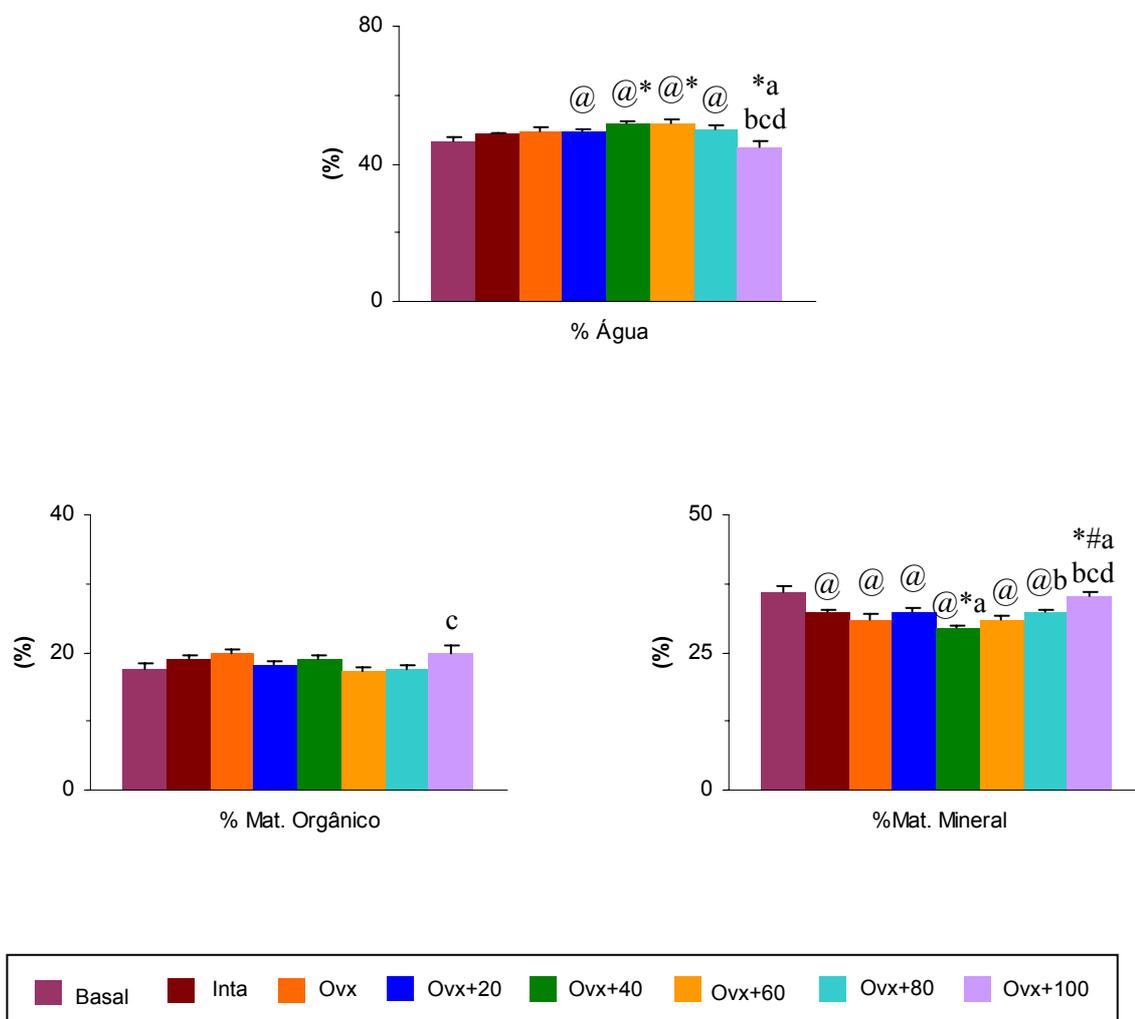


Figura 24- Parâmetros físicos do corpo vertebral das ratas dos diferentes grupos experimentais (8 meses de tratamento). Média \pm EPM. $p < 0,05$: @ vs Basal; * vs Intacto; # vs Ovx; a, b, c, d vs Ovx+20, 40, 60, 80 ppm NaF, respectivamente.

4 DISCUSSÕES

4.1 Parâmetros biométricos

Neste trabalho observou-se que as ratas dos grupos ovariectomizados (Ovx) apresentaram um aumento do ganho de peso corporal quando comparadas às ratas intactas do mesmo período. Este efeito da ovariectomia sobre o ganho de peso corpóreo dos animais foi relatado por outros autores (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; PENG et al., 1994; MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; THOMPSON et al., 1995; JIANG et al., 1996; GIAVARESI et al., 2001).

Thompson et al. (1995) demonstraram que o ganho de peso corporal acentuado em ratas Ovx é devido a um aumento da quantidade de gordura corpórea, sem qualquer alteração da massa magra destes animais. Miller, Bowman e Jee (1995) ressaltam que este aumento do ganho de peso corporal poderia ser um mecanismo de compensar a perda óssea induzida pela ovariectomia, aumentando o estresse mecânico sobre os ossos.

De modo geral, o tratamento com flúor não teve influência sobre o ganho de peso corporal dos animais, concordando com os resultados obtidos por Beary (1969), Marie e Hott (1986) e Sogaard et al. (1995). Contudo, alguns grupos (Ovx+80 ppm - 4m; Ovx+80, 100 ppm - 8m) apresentaram resultados discordantes com relação a este parâmetro. Wolinsky, Simkin e Guggenheim (1972) verificaram um marcante decréscimo do ganho de peso corpóreo de ratos tratados com alta dose de flúor (200 ppm) e associaram tal resultado a uma redução do consumo de alimento. Cheng, Huang e Low (1994) também observaram um ganho de peso corporal diminuído em ratas tratadas com 4 mmol/L de NaF, por um período de 4 meses.

Os grupos intactos dos períodos de 4 e 8 meses de tratamento exibiram um aumento da altura dos corpos vertebrais quando foram comparados ao grupo Basal, indicando que houve

crescimento dos animais em tais grupos. Surpreendentemente, este aumento da altura do corpo vertebral não se verificou nos animais do grupo Intacto do período de 6 meses de tratamento. Segundo Kalu (1991), em ratos sexualmente maduros, o crescimento ósseo é consideravelmente mais lento, mas não cessa, portanto, faz-se necessária à inclusão de um grupo de animais sacrificados no início do experimento para servir como controle Basal, evitando interpretações errôneas dos resultados.

Os grupos Ovx dos períodos experimentais de 4 e 8 meses evidenciaram uma redução da altura do corpo vertebral em relação ao grupo Intacto, contrastando com os resultados obtidos por Katsumata et al. (1995) e Ikeda et al. (2001) que não verificaram diferença entre os grupos Ovx e Intacto para este parâmetro.

4.2 Parâmetros bioquímicos

Conteúdo de flúor da tíbia direita

Apesar de não ter sido mensurada a quantidade de água fluoretada ingerida pelos animais, a incorporação do flúor administrado pôde ser verificada determinando-se o conteúdo deste mineral presente no tecido ósseo dos animais.

O conteúdo de flúor encontrado nas tíbias das ratas dos grupos Basal, Intacto e Ovx, nos diferentes períodos experimentais, é consequência das quantidades mínimas deste mineral existentes na água de torneira e na ração fornecida.

Observou-se uma relação linear entre as doses de flúor fornecidas às ratas e as concentrações deste elemento encontradas na tíbia direita das mesmas, em todos os períodos de tratamento. Autores como Modrowski et al. (1992), Sogaard et al. (1995) e Turner et al. (1996) também observaram esse efeito acumulativo do flúor em ossos de ratas.

A retenção esquelética de flúor é proporcional a quantidade ingerida, e a taxa de incorporação de flúor nos ossos diminui com o tempo de tratamento. Ainda, verifica-se uma grande variação do conteúdo de flúor de diferentes ossos e de áreas diferentes dentro de um osso longo (SUTTIE, 1980).

Søgaard et al. (1997) analisaram o conteúdo de flúor de diferentes compartimentos ósseos – osso cortical, colo femoral e corpo vertebral – em ratas submetidas ao tratamento com doses diferentes de flúor (1,0 e 10,0 mg/kg.dia) e observaram que as vértebras incorporaram quantidades maiores de flúor quando comparadas aos outros compartimentos ósseos analisados, em ambas dosagens. Segundo estes autores, a incorporação de flúor ao esqueleto é dependente das superfícies de remodelamento, sendo assim, sítios ósseos ricos em osso trabecular, que apresenta uma alta taxa de remodelamento, acumulariam maiores quantidades de flúor.

Conteúdo de cálcio e fósforo do corpo vertebral

Os animais dos grupos intactos dos períodos de 4 e 8 meses de tratamento exibiram um aumento dos parâmetros bioquímicos ósseos quando comparados aos animais do grupo Basal.

A ovariectomia promoveu uma diminuição dos conteúdos de cálcio e fósforo ósseos, em todos os períodos de tratamento, este resultado está de acordo com os trabalhos de Modrowski et al. 1992 e Giavaresi et al. 2001.

O tratamento com flúor, na maioria dos grupos, aumentou a retenção de cálcio nos corpos vertebrais, protegendo o tecido ósseo contra os efeitos danosos da ovariectomia. Saville (1967) verificou um aumento da concentração de cálcio mensurada no esqueleto axial de ratos ingerindo água fluoretada (20 ppm). Adicionalmente, este efeito protetor do flúor sobre os

parâmetros bioquímicos ósseos também foi observado por outros autores (MODROWSKI et al. 1992; GIAVARESI et al. 2001).

Todavia, alguns estudos não demonstram nenhum efeito do flúor sobre o conteúdo de cálcio dos ossos (DESHMUKH; MÉRANGER; SHAH, 1970; JIANG et al., 1996; GRYPAS et al., 1996).

4.3 Parâmetros físicos e biomecânicos do corpo vertebral

Correlacionando-se os parâmetros físicos e biomecânicos com a altura do corpo vertebral e os conteúdos de cálcio e fósforo ósseos, percebe-se que os animais dos grupos intactos dos períodos de 4 e 8 meses de tratamento exibiram o crescimento esperado pela curva ponderal desta espécie. Já os animais intactos do período experimental de 6 meses não apresentaram o comportamento esperado com relação ao crescimento, provavelmente por conta de alguma variabilidade biológica ocorrida neste lote de animais.

Kalu (1991) defende que, no modelo de ratos sexualmente maduros, a perda óssea só é verdadeira quando a massa óssea final mensurada para o grupo Ovx for inferior àquela encontrada no grupo Basal. Neste estudo, observou-se uma diminuição dos valores das densidades óssea e mineral das ratas do grupo Ovx, em relação aos grupos Basal e Intacto, para todos os períodos de tratamento. Adicionalmente, as ratas ovariectomizadas exibiram uma redução do percentual ósseo de material mineral compensada por um aumento do percentual ósseo de água, em todos os períodos analisados.

A ovariectomia promoveu uma redução dos valores de carga máxima, energia absorvida na fase elástica e tenacidade das vértebras, obtidos no teste de compressão, em todos os períodos de tratamento, corroborando os resultados encontrados na literatura (MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993; PENG et al., 1994; JIANG et al. 1996; SØGAARD et al.,

1997; SAMNEGÅRD; AKHTER; RECKER, 2001). A ovariectomia provocou um desbalanço do remodelamento ósseo, levando a uma redução da densidade mineral óssea e aumento da fragilidade dos ossos, refletida pela deterioração dos parâmetros biomecânicos, evidenciando a eficácia do procedimento metodológico em promover osteopenia nos animais.

Os grupos tratados com flúor em altas dosagens (60, 80 e 100 ppm de NaF) por períodos de 4 e 8 meses, apresentaram um aumento das densidades óssea e mineral, indicando que a terapia com flúor promoveu um aumento da massa óssea. Porém, este aumento da massa óssea não se refletiu em maior resistência mecânica dos ossos, visto que uma redução dos valores de todos os parâmetros biomecânicos mensurados foi observada em tais grupos. Este efeito negativo do flúor, em altas dosagens, sobre a biomecânica óssea foi relatado por outros autores (RIGGINS; ZEMAN; MOON, 1974; RIGGINS et al., 1976; SØGAARD et al., 1995; JIANG et al., 1996; TURNER et al., 1996; GIAVARESI et al., 2001).

Ream (1981) realizou análises histológicas dos fêmures de ratas tratadas com 120 ppm de NaF por 4 semanas e observou um aumento das camadas de osteóide na superfície periosteal da diáfise femoral, bem como um retardo da mineralização do osteóide produzido. Este autor inferiu que a mineralização deficiente do novo tecido ósseo formado poderia estar associada a uma deposição anormal das fibras de colágeno e mudanças da fase mineral óssea provocadas pela ingestão de alta dose de flúor.

Posteriormente, Turner et al. (2001) demonstraram que ratas submetidas a uma dieta com baixa concentração de cálcio e tratadas com 50mg/L de flúor apresentaram um aumento da quantidade de osteóide não-mineralizado e uma diminuição da força mecânica das vértebras. Segundo tais autores, o não-pareamento da mineralização óssea, induzido pelo flúor, parece ser a causa primária da redução da resistência mecânica óssea.

Além de promover uma mineralização deficiente da matriz óssea formada, estudos apontam que o flúor em altas concentrações também poderia modificar as propriedades

estruturais da apatita óssea. Gross e Rodriguez-Lorenzo (2004) sintetizaram *pellets* de hidroxifluorapatita com graus crescentes de substituição da hidroxila pelo flúor (0, 20, 40, 60, 80 e 100% de substituição) e testaram as propriedades mecânicas destes, utilizando técnica de microindentação. Estes autores encontraram uma redução dos valores das propriedades mecânicas dos *pellets* proporcional ao grau de substituição na hidroxifluorapatita e ressaltam que o tratamento com altas dosagens de flúor poderia tornar os ossos mais frágeis e propensos as fraturas, devido à formação de cristais de apatita altamente fluoretados.

Em contraposição a estes efeitos negativos de altas dosagens de flúor sobre a biomecânica óssea, este estudo demonstrou que baixas dosagens de flúor (20 e 40 ppm de NaF), administradas por um período de 6 meses, aumentaram os valores de densidade mineral óssea e promoveram uma proteção da integridade mecânica das vértebras, visto que nestes grupos os valores de carga máxima e tenacidade foram superiores àqueles observados para o grupo Ovx- 6m e semelhantes ao grupo Intacto do mesmo período.

Pak, Zerwekh e Antich (1995) apontam para um efeito bifásico do flúor sobre o tecido ósseo. Em baixas concentrações circulantes, a retenção esquelética de flúor é limitada e os efeitos são benéficos; em altas concentrações, a retenção esquelética é elevada podendo levar à formação de uma matriz óssea mineralizada de forma anormal, resultando em uma deterioração da qualidade óssea.

Em um estudo comparando os efeitos do estrôncio e do flúor sobre o tecido ósseo, Grynypas et al. (1996) verificaram que ratos Sprague-Dawley tratados com baixas doses de flúor (1 mg/kg PC.dia) exibiram um aumento do número de sítios de formação óssea e do volume ósseo das vértebras, sem qualquer efeito adverso sobre o perfil mineral, propriedades químicas da fase mineral óssea ou mineralização da matriz.

Lehmann et al. (1998) realizaram um estudo com populações de duas cidades alemãs e demonstraram que a população de Chemnitz, que vem sendo submetida à ingestão de

pequenas quantidades de flúor na água (1mg/L) para prevenção de cáries, apresentou um risco de desenvolver fraturas de quadril significativamente menor quando comparada à Halle, onde tal procedimento não é empregado.

Estudos realizados em humanos com baixas dosagens de flúor (≤ 50 mg/dia) ou sais de flúor de liberação lenta têm demonstrado que este mineral promove aumento da massa óssea e diminui o risco de fraturas vertebrais e de quadril em tais pacientes (BALENA et al., 1998; DUURSMA; RAYMAKERS, 1998; RUBIN et al., 2001; GUTTERIDGE et al., 2002; VON TIRPITZ et al., 2003).

Mello (2003) utilizou a mesma metodologia deste estudo e analisou as propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas dos fêmures. Este autor observou que a dose de 40 ppm de NaF, administrada por 2 e 4 meses, protegeu o tecido ósseo contra a perda óssea induzida pela ovariectomia e propiciou uma melhora da qualidade óssea, concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

O efeito do flúor sobre os fêmures relatado por Mello (2003) foi mais precoce (2 e 4 meses de tratamento) em relação ao observado neste estudo (6 meses de tratamento). Este resultado foi inesperado, tendo em vista que as vértebras por apresentarem maior quantidade de osso trabecular e conseqüentemente um *turnover* ósseo mais elevado, deveriam reagir mais prontamente à terapia com flúor.

5 CONCLUSÕES

A análise dos parâmetros bioquímicos, físicos e biomecânicos das vértebras lombares de ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio, permitiu concluir que:

- O tratamento com flúor em altas dosagens (60, 80 e 100 ppm), por períodos de 4 e 8 meses, promoveu um aumento da massa óssea, entretanto, não impediu a deterioração da qualidade óssea, induzida pela ovariectomia.

- O tratamento com flúor em baixas dosagens (20 e 40 ppm), por um período de 6 meses, apresentou um efeito protetor sobre a qualidade óssea, indicando que o flúor é um agente terapêutico potencial para prevenção da perda óssea pós-menopausal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, S. A. Normal acquisition and loss of bone mass. **Horm. Res.**, v. 60, suppl., p. 71-76, 2003.

BALENA, R. et al. Effects of different regimens of sodium fluoride treatment for osteoporosis on the structure, remodeling and mineralization of bone. **Osteoporos. Int.**, v. 8, p. 428-435, 1998.

BEARY, D. F. The effects of fluoride and low calcium on the physical properties of the rat femur. **Anat. Rec.**, v. 164, p. 305-316, 1969.

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

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

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

CAVERSAZIO, J.; PALMER, G.; BONJOUR, J. P. Fluoride: mode of action. **Bone**, v.22, n. 6, p. 585-589, 1998.

CHENG, P. T.; HUANG, L.; LOW, N. Sodium fluoride does not build bone in aged ovariectomized rats. **Cell. Mater.**, v. 4, n. 3, p. 299-307, 1994.

CURY, J. A. **Estudo do metabolismo do flúor em função da sua administração a ratas por períodos pré-natais sucessivos**. 1984. 136f. Tese (Livre-docência em Bioquímica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1984.

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

DESHMUKH, D. S.; MÉRANGER, J. C.; SHAH, B. G. The effect of dietary fluoride on calcium and phosphorus metabolism of rats. **Can. J. Physiol. Pharm.**, v. 48, n. 8, p. 503-509, 1970.

DUURSMA, S. A.; RAYMAKERS, J.A. Fluoride treatment: a good choice in osteoporosis. **Ned Tijdschr Geneeskd.**, v. 142, n.34, p. 1915-1919, 1998.

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

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

ERIKSEN, E. F.; MELSEN, F.; MOSEKILDE, L. Drug therapy: formation-stimulating regimens. In: **Osteoporosis: etiology, diagnosis and management**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995. p. 403-418.

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

GIAVARESI, G. et al. Comparison of calcitonin, alendronate and fluorophosphate effects on ovariectomized rat bone. **Biomed. Pharmacother.**, v. 55, p. 397-403, 2001.

GROSS, K. A.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. M. Sintered hydroxyfluorapatites. Part II. Mechanical properties of solid solutions determined by microindentation. **Biomaterials**, v. 25, p.1385-1394, 2004.

GRYNPAS, M. D.; CHENG, P. T. Fluoride reduces the rate of dissolution of bone. **Bone Miner.**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1988.

GRYNPAS, M. D. et al. Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. **Bone**, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.

GUTTERIDGE, D. H. et al. A randomized trial of sodium fluoride (60 mg) +/- estrogen in postmenopausal osteoporotic vertebral fractures: increased vertebral fractures and peripheral bone loss with sodium fluoride; concurrent estrogen prevents peripheral loss, but not vertebral fractures. **Osteoporos. Int.**, v.13, n. 2, p. 158-170, 2002.

HENRY, Y. M.; FATAYERJI, D.; EASTELL, R. Attainment of peak bone mass at the lumbar spine, femoral neck and radius in men and women: relative contributions of bone size and volumetric bone mineral density. **Osteoporos. Int.**, v. 15, p. 263-273, 2004.

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

JIANG, Y. et al. Effects of low-dose long-term sodium fluoride preventive treatment on rat bone mass and biomechanical properties. **Calcif. Tiss. Int.**, v. 58, p. 30-39, 1996.

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

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

KASSEM, M.; MELTON III, L. J.; RIGGS, B. L. The typeI/typeII model for involuntional osteoporosis. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 691-702.

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

KLEEREKOPER, M. Fluoride and the skeleton. In: BILEZIKIAN, J. P. et al. **Principles of bone biology**. Califórnia: Academic Press, 1996, p. 1053-1062.

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

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

LEHMANN, R. et al. Drinking water fluoridation: bone mineral density and hip fracture incidence. **Bone**, v. 22, n. 3, p. 273-278, 1998.

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

LIBANATI, C.; LAU, K. H. W.; BAYLINK, D. Fluoride therapy for osteoporosis. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 1259-1277.

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

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

MARIE, P. J.; HOTT, M. Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse. **Metabolis.**, v. 35, n. 6, p. 547-551, 1986.

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

MCDOWELL, L. R. Fluorine. In:_____. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992, p. 333-351.

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

MILLER, S. C.; BOWMAN, B. M.; JEE, W. S. S. Available animal models of osteopenia – small and large. **Bone**, v. 17, n. 4, suppl., p.117-123, 1995.

MODROWSKI, D. et al. Effect of fluoride on bone and bone cells in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 7, n. 8, p. 961-969, 1992.

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

PAK, C. Y. C.; ZERWEKH, J. E.; ANTICH, P. Anabolic effects of fluoride on bone. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.6, n. 7, p. 229-234, 1995.

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

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

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

POSNER, A. S. et al. X-ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite. **Arch. Oral Biol.**, v.8, p.549-570, 1994.

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

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

REAM, L. J. The effects of short-term fluoride ingestion on bone formation and resorption in the rat femur. **Cell Tiss. Res.**, v. 221, p. 421-430, 1981.

RIGGINS, R. S.; ZEMAN, F.; MOON, D. The effects of sodium fluoride on bone breaking strength. **Calc. Tiss. Res.**, v. 14, p. 283-289, 1974.

RIGGINS, R. S. et al. The effect of fluoride supplementation on the strength of osteopenic bone. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 114, p. 353-357, 1976.

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

RUBIN, C. D. et al. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. **Arch. Intern. Med.**, v. 161, n.19, p. 2325-2333, 2001.

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

SAVILLE, P. D. Water fluoridation: effect on bone fragility and skeletal calcium content in the rat. **J. Nutrition**, v. 91, p. 353-357, 1967.

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

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

SØGAARD, C. H. et al. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. **Bone**, v.20, n. 5, p. 439-449, 1997.

SUTTIE, J. W. Nutritional aspects of fluoride toxicosis. **J. Anim. Sci.**, v. 51, n. 3, p. 759-766, 1980.

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

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v. 14, p. 595-608, 1993.

TURNER, C.H. et al. High fluoride intakes cause osteomalacia and diminished bone strength in rats with renal deficiency. **Bone**, v. 19, v. 6, p. 595-601, 1996.

TURNER, C. H. et al. Combined effects of diets with reduced calcium and phosphate and increased fluoride intake on vertebral bone strength and histology in rats. **Calcif. Tiss. Int.**, v. 69, n. 1, p. 51-57, 2001.

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

VON TIRPITZ, C. et al. Therapy of osteoporosis in patients with Crohn's disease: a randomized study comparing sodium fluoride and ibandronate. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 17, p. 807-816, 2003.

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

WOLINSKY, I.; SIMKIN, A.; GUGGENHEIM, K. Effects of fluoride on metabolism and mechanical properties of rat bone. **Am. J. Physiol.**, v. 223, n. 1, p. 46-50, 1972.

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

ZHANG, M. et al. Effect of sodium fluoride on bone turnover and bone loss of vertebrae and tibia in ovariectomized rats. **Zhon. Bing Li Xue Za Zhi**, v. 29, n.1, p.49-52, 2000.

Tabela A- Probabilidade (p) resultante do teste estatístico aplicado aos parâmetros biométricos, biomecânicos e bioquímicos dos grupos de 4 meses de tratamento.

	Parâmetros							
	PC final (g)	Ganho PC (g)	Altura (mm)	Carga Max. (N)	E. absorv. Elást. (J)	Tenacidade (MPa)	Ca++ (mg/vért.)	Fósforo (mg/vért.)
Basal vs Inta	-----	-----	<0,0001	0,5414	0,0152	0,9626	0,0010	0,0010
Basal vs Ovx	-----	-----	0,0030	0,8421	0,4470	0,6607	0,1823	0,7802
Basal vs Ovx+20	-----	-----	0,1135	0,2973	>0,9999	0,2581	0,4363	>0,9999
Basal vs Ovx+40	-----	-----	0,1738	0,2991	0,2523	0,4079	0,0907	0,8371
Basal vs Ovx+60	-----	-----	0,0206	0,0927	0,6730	0,0745	0,0037	0,0360
Basal vs Ovx+80	-----	-----	0,2991	0,0164	0,1738	0,0229	0,1142	>0,9999
Basal vs Ovx+100	-----	-----	0,0360	0,0663	0,1810	0,0663	0,0076	0,1810
Inta vs Ovx	0,0155	<0,0001	0,0205	0,6965	0,0434	0,5148	0,0117	0,0343
Inta vs Ovx+20	0,0152	<0,0001	0,0006	0,1388	0,0025	0,2359	0,0079	0,0025
Inta vs Ovx+40	0,0006	0,0003	0,0093	0,1206	0,0093	0,4634	0,2810	0,0401
Inta vs Ovx+60	0,0003	0,0002	0,0011	0,0281	0,0148	0,1049	0,1049	0,2345
Inta vs Ovx+80	0,1893	0,0140	0,0012	0,0059	0,0022	0,0401	0,0093	0,0059
Inta vs Ovx+100	0,0200	0,0007	0,0080	0,0127	0,0127	0,1079	0,4136	0,1812
Ovx vs Ovx+20	0,7197	0,6607	0,2110	0,2110	0,6038	0,6607	0,8421	>0,9999
Ovx vs Ovx+40	0,0878	>0,9999	0,3638	0,4747	0,1331	0,6009	0,4173	0,7396
Ovx vs Ovx+60	0,2743	0,3599	0,4082	0,0676	0,2370	0,2370	0,0434	0,1220
Ovx vs Ovx+80	0,2295	0,0031	0,0878	0,0185	0,1088	0,0878	0,6691	0,4747
Ovx vs Ovx+100	0,8749	0,2635	0,7128	0,0727	0,1806	0,1806	0,0420	0,5622
Ovx+20 vs Ovx+40	0,0907	0,6806	0,8371	0,8371	0,6065	0,6806	0,5360	0,8371
Ovx+20 vs Ovx+60	0,0745	0,2766	0,9626	>0,9999	0,7430	0,7430	0,0927	0,0745
Ovx+20 vs Ovx+80	0,1738	0,0052	0,6806	0,3510	0,2105	0,3510	0,9182	0,7577
Ovx+20 vs Ovx+100	>0,9999	0,2238	0,6070	0,4559	0,5287	0,3277	0,0496	0,2238
Ovx+40 vs Ovx+60	0,3357	0,3969	0,7789	0,4634	0,3969	0,3969	0,5358	0,1206
Ovx+40 vs Ovx+80	0,0023	0,0175	0,6200	0,1649	0,6200	0,1282	0,6200	0,9015
Ovx+40 vs Ovx+100	0,0350	0,7308	0,5338	0,4452	0,8357	0,2343	0,3660	0,4452
Ovx+60 vs Ovx+80	0,0059	0,0401	0,4634	0,4634	0,3357	0,4634	0,0401	0,0140
Ovx+60 vs Ovx+100	0,0813	0,5728	0,6620	0,6620	0,2284	0,7546	0,6620	0,4908
Ovx+80 vs Ovx+100	0,2343	0,0140	0,2343	0,5338	0,6282	0,6282	0,0513	0,3660

Tabela B- Probabilidade (p) resultante do teste estatístico aplicado aos parâmetros físicos dos grupos de 4 meses de tratamento.

	Parâmetros									
	P. imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. cinzas (g)	Vol. ósseo (cm ³)	D. óssea (g/cm ³)	D. mineral (g/cm ³)	%Água	% Mat. orgânico	% Mat. mineral
Basal vs Inta	0,0003	<0,0001	0,0006	0,0079	<0,0001	0,2766	0,0079	0,0016	0,3704	0,0003
Basal vs Ovx	0,0653	0,0003	0,2428	0,3562	<0,0001	0,0350	<0,0001	0,0002	0,1823	<0,0001
Basal vs Ovx+20	0,1903	0,0503	0,5457	0,6048	0,0315	0,2224	0,0005	0,0005	0,0770	0,0005
Basal vs Ovx+40	0,9182	0,1142	0,2105	0,2991	0,0115	0,1738	0,1142	0,8371	0,7577	0,3510
Basal vs Ovx+60	0,0037	0,0010	0,0111	0,0592	0,0025	0,7430	0,4234	0,2359	0,1139	0,2359
Basal vs Ovx+80	0,1738	0,2523	0,5360	0,7577	0,2523	>0,9999	0,0542	0,0311	0,4079	0,0079
Basal vs Ovx+100	0,0256	0,0879	0,1135	0,0663	0,1447	0,2721	0,8639	0,7756	0,9546	0,7756
Inta vs Ovx	0,0031	0,0266	0,0062	0,0044	0,1011	0,0002	0,0545	0,1220	0,1011	0,5148
Inta vs Ovx+20	0,0003	0,0037	0,0152	0,0274	0,0274	0,0037	0,5414	0,6058	0,0927	0,6058
Inta vs Ovx+40	0,0093	0,0037	0,0401	0,0541	0,0205	0,0205	0,3969	0,0140	0,2810	0,0205
Inta vs Ovx+60	0,0019	0,0030	0,0148	0,0379	0,0104	0,2786	0,0499	0,0281	0,5054	0,0070
Inta vs Ovx+80	0,0006	0,0006	0,0022	0,0037	0,0022	0,2319	0,1893	0,0541	0,7789	0,2050
Inta vs Ovx+100	0,1419	0,1079	0,4908	0,5728	0,0813	0,4908	0,0047	0,0027	0,5728	0,0027
Ovx vs Ovx+20	0,4967	0,9682	0,9682	0,8421	0,4002	0,3154	0,0947	0,4470	0,8421	0,1823
Ovx vs Ovx+40	0,3638	0,3638	0,6691	0,8868	0,2295	0,5362	0,0250	0,0012	0,0553	0,0068
Ovx vs Ovx+60	0,0831	0,6965	0,0831	0,0117	0,2031	0,0044	0,0014	0,0021	0,1728	0,0014
Ovx vs Ovx+80	0,9623	0,0330	0,6009	0,8868	0,0136	0,0007	0,0031	0,0068	0,0702	0,0068
Ovx vs Ovx+100	0,2198	>0,9999	0,2635	0,2635	0,5622	0,0010	0,0002	0,0005	0,0160	0,0010
Ovx+20 vs Ovx+40	0,6806	0,7577	0,6065	>0,9999	0,7577	0,6065	0,2105	0,0052	0,0164	0,0311
Ovx+20 vs Ovx+60	0,5414	0,8148	0,5414	0,2766	0,7430	0,0592	0,0111	0,0111	0,1996	0,0111
Ovx+20 vs Ovx+80	0,4698	0,2991	0,6806	0,5360	0,2523	0,0418	0,0311	0,0311	0,0907	0,1142
Ovx+20 vs Ovx+100	0,2721	0,6070	0,2721	0,3277	0,8639	0,0016	0,0016	0,0008	0,0496	0,0028
Ovx+40 vs Ovx+60	0,1520	0,3969	0,3357	0,2319	0,6943	0,4010	0,3969	0,3969	0,1206	0,8665
Ovx+40 vs Ovx+80	0,3176	0,5350	0,4557	0,4557	0,2593	0,0728	0,9015	0,2086	0,3176	0,3176
Ovx+40 vs Ovx+100	0,2343	0,6282	0,5338	0,4452	0,9452	0,0140	0,1014	0,7308	>0,9999	0,5338
Ovx+60 vs Ovx+80	0,0541	0,1206	0,0939	0,0401	0,1520	0,9551	0,3969	0,5358	0,2810	0,2810
Ovx+60 vs Ovx+100	0,6620	0,8518	0,7546	0,7546	0,9497	0,3450	0,2284	0,2824	0,4136	0,4908
Ovx+80 vs Ovx+100	0,2949	0,5338	0,1375	0,1375	0,4452	0,1014	0,0350	0,0734	0,8357	0,0350

Tabela C- Probabilidade (p) resultante do teste estatístico aplicado aos parâmetros biométricos, biomecânicos e bioquímicos dos grupos de 6 meses de tratamento.

	Parâmetros							
	PC final (g)	Ganho PC (g)	Altura (mm)	Carga Max. (N)	E. absorv. Elást. (J)	Tenacidade (MPa)	Ca++ (mg/vért.)	Fósforo (mg/vért.)
Basal vs Inta	-----	-----	0,6806	0,5360	0,1738	0,3510	0,2105	0,7577
Basal vs Ovx	-----	-----	0,0055	0,0079	0,4807	0,0037	0,6058	0,4807
Basal vs Ovx+20	-----	-----	0,0188	0,6665	0,0244	0,2973	0,0400	0,4363
Basal vs Ovx+40	-----	-----	0,1447	0,8639	0,4559	0,6070	0,0668	0,0360
Basal vs Ovx+60	-----	-----	0,0010	0,0464	0,9626	0,0927	0,0079	0,0079
Basal vs Ovx+80	-----	-----	0,2105	0,0012	0,0052	0,0002	0,9182	0,2523
Basal vs Ovx+100	-----	-----	0,0115	0,0311	0,2523	0,0549	0,0907	0,1142
Inta vs Ovx	0,2319	0,3357	0,0401	0,0003	0,1206	0,0140	0,3357	0,8665
Inta vs Ovx+20	0,2105	0,9182	0,0712	0,2523	0,8371	0,9182	0,5360	0,2991
Inta vs Ovx+40	0,0047	0,0221	0,1807	0,1375	0,3660	0,6282	0,6282	0,1014
Inta vs Ovx+60	0,0006	0,0059	0,0401	0,0205	0,2810	0,4634	0,1893	0,0140
Inta vs Ovx+80	0,0262	0,0111	0,7104	0,0006	0,0006	0,0006	0,2086	0,5350
Inta vs Ovx+100	0,0041	0,0006	0,1282	0,0006	0,0262	0,1649	0,7104	0,1282
Ovx vs Ovx+20	0,8148	0,3704	0,2359	0,0037	0,0206	0,0274	0,1139	0,0274
Ovx vs Ovx+40	0,0593	0,4908	0,1812	0,0007	0,2284	0,0080	0,1079	0,0047
Ovx vs Ovx+60	0,0379	0,2345	0,7984	0,3282	0,5737	0,0281	0,0148	0,0011
Ovx vs Ovx+80	0,2810	0,1893	0,0059	0,3357	0,3327	0,9551	0,1893	0,9551
Ovx vs Ovx+100	0,0939	0,1206	0,6943	0,4634	0,9551	0,2319	0,0939	0,0205
Ovx+20 vs Ovx+40	0,1810	0,1447	0,5287	0,9546	0,1810	0,6889	0,9546	0,0879
Ovx+20 vs Ovx+60	0,1139	0,1388	0,5414	0,1388	0,1139	>0,9999	0,1672	0,0274
Ovx+20 vs Ovx+80	0,4079	0,0311	0,0164	0,0052	0,0002	0,0052	0,0164	0,0418
Ovx+20 vs Ovx+100	0,3510	0,0418	0,9182	0,0164	0,0003	0,6806	0,9182	0,3510
Ovx+40 vs Ovx+60	>0,9999	0,6620	0,2284	0,1419	0,5728	0,1812	0,4136	0,4908
Ovx+40 vs Ovx+80	0,5338	0,2343	0,0734	0,0012	0,0023	0,0012	0,0221	0,0082
Ovx+40 vs Ovx+100	0,6282	0,8357	0,2949	0,0023	0,0513	0,0221	0,6282	0,5338
Ovx+60 vs Ovx+80	0,5358	0,1520	0,0140	0,0939	0,0721	0,0012	0,0012	0,0006
Ovx+60 vs Ovx+100	0,6943	0,3969	0,6126	0,6943	0,3969	0,5358	0,2810	0,1206
Ovx+80 vs Ovx+100	0,8048	0,7104	0,0175	0,0728	0,0728	0,0175	0,0262	0,0023

Tabela D- Probabilidade (p) resultante do teste estatístico aplicado aos parâmetros físicos dos grupos de 6 meses de tratamento.

	Parâmetros									
	P. imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. cinzas (g)	Vol. ósseo (cm ³)	D. óssea (g/cm ³)	D. mineral (g/cm ³)	%Água	% Mat. orgânico	% Mat. mineral
Basal vs Inta	0,4698	0,9182	0,8371	>0,9999	0,9182	0,1738	0,6065	0,6065	0,7577	0,9182
Basal vs Ovx	0,1672	0,0006	0,6058	0,8884	0,0010	0,1139	<0,0001	<0,0001	0,1996	<0,0001
Basal vs Ovx+20	0,0188	0,0028	0,1359	0,2224	0,0056	0,2224	0,0003	<0,0001	0,2581	0,0002
Basal vs Ovx+40	0,0048	0,0008	0,0048	0,0360	0,0004	0,8639	0,0176	0,0663	0,5287	0,0004
Basal vs Ovx+60	0,0016	0,0002	0,0010	0,0464	0,0002	0,6730	0,0055	0,0037	0,9626	0,0006
Basal vs Ovx+80	0,6806	0,7577	0,4698	0,1738	0,6065	0,2105	0,0033	0,0079	0,9182	0,0021
Basal vs Ovx+100	0,0418	0,0012	0,0712	0,4079	0,0002	0,1738	0,0033	0,0079	>0,9999	0,0052
Inta vs Ovx	0,8665	0,1206	0,6126	0,8665	0,0289	0,0012	0,0003	0,0003	0,1893	0,0003
Inta vs Ovx+20	0,4698	0,1142	0,2991	0,4079	0,0311	0,0079	0,0012	0,0002	0,3510	0,0012
Inta vs Ovx+40	0,2393	0,0513	0,0734	0,1375	0,0513	0,1014	0,0221	0,1014	0,0734	0,0350
Inta vs Ovx+60	0,0401	0,0140	0,0401	0,0939	0,0205	0,1520	0,0093	0,0022	0,6126	0,0037
Inta vs Ovx+80	0,3829	>0,9999	0,6200	0,3829	0,6200	0,0012	0,0070	0,0262	0,6200	0,0262
Inta vs Ovx+100	0,6200	0,0530	0,3829	0,5350	0,0530	0,0023	0,0023	0,0262	0,9015	0,0041
Ovx vs Ovx+20	0,3704	0,8884	0,3213	0,1672	0,8884	0,1672	0,0079	0,0079	0,8148	0,0016
Ovx vs Ovx+40	0,0426	0,5728	0,0426	0,0293	0,9497	0,0127	0,0007	0,0200	0,0426	0,0007
Ovx vs Ovx+60	0,0070	0,1304	0,0104	0,0207	0,4418	0,0070	0,0030	0,0019	0,0499	0,0030
Ovx vs Ovx+80	0,0401	0,0093	0,0289	0,1206	0,0093	0,2810	0,0093	0,0093	0,1206	0,0012
Ovx vs Ovx+100	0,6943	0,8665	0,0721	0,1206	0,8665	0,2810	0,0022	0,0093	0,2810	0,0022
Ovx+20 vs Ovx+40	0,2721	0,8639	0,3884	0,6070	>0,9999	0,2721	0,0879	0,0496	0,0879	0,1135
Ovx+20 vs Ovx+60	0,0745	0,3213	0,0927	0,1996	0,3704	0,0927	0,1996	0,0274	0,1139	0,4234
Ovx+20 vs Ovx+80	0,0007	0,0115	0,0164	0,0115	0,0115	0,2991	0,5360	0,1416	0,1738	0,2991
Ovx+20 vs Ovx+100	>0,9999	0,9182	0,6065	>0,9999	>0,9999	0,3510	0,9182	0,2991	0,2991	0,7577
Ovx+40 vs Ovx+60	0,2284	0,2284	0,4136	0,7546	0,2284	0,8518	0,5728	0,3450	0,3450	0,4908
Ovx+40 vs Ovx+80	0,0012	0,0023	0,0012	0,0012	0,0082	0,0734	0,3660	0,7308	0,3660	>0,9999
Ovx+40 vs Ovx+100	0,1375	0,2343	0,1014	0,1014	0,5338	0,0734	0,0734	0,3660	0,5338	0,1807
Ovx+60 vs Ovx+80	0,0003	0,0012	0,0006	0,0006	0,0037	0,0205	>0,9999	0,6126	>0,9999	0,6943
Ovx+60 vs Ovx+100	0,0140	0,1520	0,0541	0,1520	0,2319	0,0205	0,1520	0,3357	>0,9999	0,4634
Ovx+80 vs Ovx+100	0,0012	0,0041	0,0023	0,0023	0,0262	0,7104	0,5350	0,6200	>0,9999	0,6200

Tabela E- Probabilidade (p) resultante do teste estatístico aplicado aos parâmetros biométricos, biomecânicos e bioquímicos dos grupos de 8 meses de tratamento.

	Parâmetros							
	PC final (g)	Ganho PC (g)	Altura (mm)	Carga Max. (N)	E. absorv. Elást. (J)	Tenacidade (MPa)	Ca ⁺⁺ (mg/vért.)	Fósforo (mg/vért.)
Basal vs Inta	-----	-----	<0,0001	0,0653	0,0789	0,2775	0,0021	0,0015
Basal vs Ovx	-----	-----	0,7430	0,7430	0,7430	0,6730	0,3704	0,9626
Basal vs Ovx+20	-----	-----	>0,9999	0,1738	0,0418	0,6065	0,0164	0,1738
Basal vs Ovx+40	-----	-----	0,0653	0,0030	0,0220	0,0010	0,3154	0,4470
Basal vs Ovx+60	-----	-----	0,7430	0,0274	0,0274	0,0025	0,2359	0,9626
Basal vs Ovx+80	-----	-----	0,0008	0,2721	0,5287	0,0879	0,0256	0,0663
Basal vs Ovx+100	-----	-----	0,0360	0,5287	0,0360	0,0256	0,0360	0,3884
Inta vs Ovx	0,0831	0,0155	0,0014	0,3599	0,2743	0,2743	0,0434	0,0266
Inta vs Ovx+20	0,0185	0,0068	0,0001	0,4173	0,5362	0,0553	0,2295	0,1331
Inta vs Ovx+40	0,6305	0,1431	0,0039	0,0002	0,0029	<0,0001	0,0185	0,0147
Inta vs Ovx+60	0,6334	0,1728	0,0031	0,0014	0,0009	<0,0001	0,1220	0,0117
Inta vs Ovx+80	0,0420	0,0010	0,7925	0,0075	0,0160	0,0047	0,8749	0,4923
Inta vs Ovx+100	0,0559	0,0010	0,0727	0,0225	0,0110	0,0017	0,2635	0,0312
Ovx vs Ovx+20	0,0541	0,3969	0,6943	0,6943	0,9390	>0,9999	0,3357	0,2319
Ovx vs Ovx+40	0,5726	0,6965	0,2743	0,0062	0,1728	0,0117	0,8968	0,7618
Ovx vs Ovx+60	0,1605	0,3823	0,6454	0,0281	0,1949	0,0499	0,6454	0,7209
Ovx vs Ovx+80	0,4136	0,0080	0,0080	0,3450	0,4980	0,5728	0,2824	0,3450
Ovx vs Ovx+100	0,1812	0,0200	0,1419	0,5728	0,3450	0,4908	0,3450	0,5728
Ovx+20 vs Ovx+40	0,0431	0,2295	0,0702	0,0007	0,0031	0,0185	0,1331	0,5362
Ovx+20 vs Ovx+60	0,0059	0,0939	0,6943	0,0022	0,0022	0,0205	0,2810	0,1893
Ovx+20 vs Ovx+80	0,6282	0,0513	0,0012	0,0350	0,0140	0,2343	0,2343	0,3660
Ovx+20 vs Ovx+100	0,4482	0,1375	0,0350	0,0513	0,0140	0,1807	0,9452	0,5338
Ovx+40 vs Ovx+60	0,5148	0,5726	0,4598	0,3154	0,9654	0,7618	0,6965	0,8968
Ovx+40 vs Ovx+80	0,2635	0,0047	0,0160	0,1471	0,4278	0,0420	0,0727	0,0934
Ovx+40 vs Ovx+100	0,2198	0,0160	0,8749	0,0160	0,1471	0,1471	0,1471	0,6354
Ovx+60 vs Ovx+80	0,0426	0,0013	0,0127	0,3450	0,3450	0,0831	0,2284	0,1812
Ovx+60 vs Ovx+100	0,0813	0,0080	0,3450	0,1079	0,3450	0,1419	0,4136	0,7546
Ovx+80 vs Ovx+100	0,8182	0,6991	0,0649	0,6991	0,3939	0,6991	0,3939	0,3095

Tabela F- Probabilidade (p) resultante do teste estatístico aplicado aos parâmetros físicos dos grupos de 8 meses de tratamento.

	Parâmetros									
	P. imerso (g)	P. úmido (g)	P. seco (g)	P. cinzas (g)	Vol. ósseo (cm ³)	D. óssea (g/cm ³)	D. mineral (g/cm ³)	%Água	% Mat. orgânico	% Mat. mineral
Basal vs Inta	0,2110	0,0003	0,0015	0,0172	<0,0001	0,0057	0,0003	0,0535	0,1823	0,0004
Basal vs Ovx	0,1996	0,4807	0,6730	0,8148	0,0464	0,0010	<0,0001	0,1672	0,1672	0,0006
Basal vs Ovx+20	0,4698	0,0311	0,0907	0,2991	0,0003	0,0012	0,0021	0,0418	0,8371	0,0115
Basal vs Ovx+40	0,1823	0,0220	0,1128	0,8421	0,0076	0,0653	<0,0001	0,0041	0,6038	<0,0001
Basal vs Ovx+60	0,0592	0,0360	0,8884	0,8884	0,0464	0,9626	0,0055	0,0037	0,5414	0,0006
Basal vs Ovx+80	0,0028	0,0004	0,0048	0,0120	0,0004	0,4559	0,0879	0,0176	0,6070	0,0048
Basal vs Ovx+100	0,3277	0,1447	0,1447	0,2238	0,0879	0,6889	>0,9999	0,5287	0,0879	>0,9999
Inta vs Ovx	0,0434	0,0676	0,0545	0,0434	0,0831	0,0676	0,1220	0,8286	0,8286	0,4598
Inta vs Ovx+20	0,1613	0,1331	0,1088	0,1613	0,1088	0,1613	0,2698	0,3148	0,2698	0,6691
Inta vs Ovx+40	0,7394	0,1051	0,0147	0,0115	0,0089	0,0355	0,1431	0,0068	0,6305	0,0015
Inta vs Ovx+60	0,8286	0,0085	0,0009	0,0031	0,0003	<0,0001	0,3154	0,0266	0,1011	0,1728
Inta vs Ovx+80	0,0420	0,8749	0,7925	0,7128	0,2635	0,0002	0,0420	0,2198	0,0727	0,7925
Inta vs Ovx+100	0,9578	0,0160	0,1179	0,1806	0,0017	0,0110	0,0005	0,0225	0,4278	0,0017
Ovx vs Ovx+20	0,3357	0,2810	0,2810	0,2319	0,3357	0,4634	0,2810	0,9551	0,1893	0,5358
Ovx vs Ovx+40	0,0676	0,4598	0,5726	0,6334	0,8968	0,0014	0,5726	0,1457	0,4598	0,0831
Ovx vs Ovx+60	0,0379	0,5054	0,7984	0,5737	0,7984	0,0002	0,0030	0,1304	0,0650	0,9591
Ovx vs Ovx+80	0,0080	0,1419	0,1419	0,1079	0,2824	0,0007	0,0027	0,5728	0,0593	0,2824
Ovx vs Ovx+100	0,1079	0,8518	0,3450	0,2284	0,6620	0,0013	0,0007	0,1079	0,7546	0,0007
Ovx+20 vs Ovx+40	0,1088	0,8868	0,7396	0,2698	0,9623	0,0031	0,4173	0,0878	0,5362	0,0068
Ovx+20 vs Ovx+60	0,0205	0,6943	0,1520	0,1520	0,0205	0,0003	0,1893	0,1206	0,3969	0,3969
Ovx+20 vs Ovx+80	0,0012	0,0734	0,0734	0,1014	0,3660	0,0012	0,0734	0,6282	0,2343	0,6282
Ovx+20 vs Ovx+100	0,1375	0,3660	0,8357	0,9452	0,1807	0,0012	0,0047	0,0350	0,1014	0,0221
Ovx+40 vs Ovx+60	0,8968	0,1011	0,3154	0,6965	0,0676	0,0085	0,0155	0,8286	0,1220	0,1220
Ovx+40 vs Ovx+80	0,0160	0,2198	0,0727	0,0110	0,5622	0,0160	0,0047	0,2198	0,0934	0,0030
Ovx+40 vs Ovx+100	>0,9999	0,4923	0,6354	0,3676	0,1179	0,2635	0,0002	0,0017	0,3132	0,0002
Ovx+60 vs Ovx+80	0,0013	0,0013	0,0047	0,0080	0,0027	0,6620	0,2284	0,2284	0,6620	0,1812
Ovx+60 vs Ovx+100	0,6620	0,9497	0,2824	0,2824	0,8518	0,9497	0,0027	0,0047	0,0426	0,0047
Ovx+80 vs Ovx+100	0,1320	0,0931	0,2403	0,2403	0,0411	0,8182	0,0411	0,0087	0,0649	0,0022