

# **Metodologia para avaliação da perda de massa óssea em *Rattus norvegicus***

**Nélia Filipa Martins Dias**

Relatório Final do Trabalho de Projecto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efectuado sob orientação de:

**Professora Ana Isabel Pereira**

**Professora Elza Maria Morais Fonseca**

**Professora Marlene Vargas Vilória**

Dezembro de 2013



# **Metodologia para avaliação da perda de massa óssea em *Rattus norvegicus***

**Nélia Filipa Martins Dias**

Relatório Final do Trabalho de Projecto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efectuado sob orientação de:

**Professora Ana Isabel Pereira**

**Professora Elza Maria Morais Fonseca**

**Professora Marlene Vargas Vilória**

Dezembro de 2013



## **Agradecimentos**

Este projecto não teria sido possível sem a ajuda de inúmeras pessoas e instituições que contribuíram para a sua realização e também para a minha formação, estudantil e humana.

Um muito obrigado às minhas orientadoras, Ana Isabel Pereira e Elza Fonseca, por terem aceitado orientar-me, e ajudando a que este projecto se torna-se possível, esclarecendo as minhas dúvidas.

À minha orientadora Marlene Vilória, por ter aceite que eu participasse neste projecto, um muito obrigado pela simpatia e generosidade com que me recebeu em Viçosa, juntamente com o professor Patarroyo.

Fabrcício, obrigado pela sempre compreensão, paciência e ajuda em esclarecer as minhas dúvidas, e como não podia deixar de ser, também pela amizade.

João Paulo, foi muito bom participar deste projecto, obrigado pela sua generosidade em me deixar trabalhar com o seu projecto.

Professor Mário Jefferson, Carol e senhor Pedro, obrigado por me terem recebido e ajudado em Araçatuba, e contribuído para que uma parte deste trabalho fosse possível.

Ao senhor Adão e Cláudio, obrigado pela e ajuda e conversas.

À professora Isabel Ferreira pelo contributo neste trabalho.

Obrigado ao pessoal do LBCHV/BIOAGRO, em especial ao Gabriel, pela ajuda.

Ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Federal de Viçosa, por tornar possível este intercâmbio.

A todos os Professores que acompanharam o meu percurso académico.

À Zézinha, Joana's, Tita, Mónica, Aziz, Pamme e Paola (las hermanas ), e a todos os outros amigos por compreenderem a minha ausência, e sempre me motivarem a seguir em frente, e participarem da minha vida.

Nancy, obrigado pela segunda família em Bragança.

Jairson obrigado por tudo.

À minha família pelo incentivo, e ajuda, sem eles nada daquilo em que me tornei seria possível, em especial ao meu irmão, por termos crescido juntos.

Paulo e Celeste por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

À minha avó Maria por me fazer acreditar na bondade e generosidade das pessoas.

A todos aqui citados os meus sinceros agradecimentos!



## **Resumo**

O objectivo deste trabalho é estudar qual a influência que poderá ter o *stress*, conjuntamente com o descontrolo hormonal (glucocorticoides e hormona de crescimento) e descontrolo imunitário, em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar de três faixas etárias, jovens, adultos e idosos, géneros feminino e masculino.

Foram feitos testes mecânicos, recorrendo à utilização de uma máquina EMIC, exames de densitometria óssea (DEXA), no fémur, vértebra e tíbia, de cada um dos indivíduos, bem com uma análise histoquímica, desses mesmos tecidos. Foi efectuada uma análise comparativa entre os diferentes parâmetros e verificação da relevância na perda de massa óssea, com objectivo de verificar o risco de fractura.

O estudo possibilitará extrapolar o conhecimento obtido em *Rattus norvegicus* para estruturas ósseas de humanos, utilizando metodologias simples e válidas sobre a perda da massa óssea.

Palavras-chave: Glucocorticóides, hormona de crescimento, perda de massa óssea, *stresse*.



## **Abstract**

The objective of this work is to study the influence of stress, combined with a hormonal disorder (glucocorticoids and growth hormone) and immunity disorder in *Rattus norvegicus* or Wistar species, three age groups, youth, adults and senior female and male. Mechanical tests were made through the use of an EMIC machine tests densitometry (DEXA), femur, vertebra and tibia of each individual and with immunohistochemical analysis of these same tissues. A comparative analysis between different parameters and verification of relevance in bone damage, with the aim to determine the risk of fracture will take place.

This study will allow to extrapolate the knowledge obtained in *Rattus norvegicus* for human bone structures, using simple and valid methodologies for the bone mass loss.

Keywords: Glucocorticoids, growth hormone, bone loss, stress.



## Índice

<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>- 1 -</b>
Introdução .....	- 1 -
1.1 Motivação e objectivo do trabalho .....	- 1 -
1.2 Estrutura do Relatório.....	- 2 -
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>3</b>
Estruturas ósseas e patologias associadas.....	3
2.1 Ossos.....	3
2.1.2 Diferentes tipos de tecido ósseo .....	4
2.1.3 Remodelação óssea.....	6
2.1.3.1 Osteoblastos.....	6
2.1.3.2. Osteoclastos .....	7
2.2. Causas associadas à diminuição de massa óssea .....	10
2.2.1. Envelhecimento .....	10
2.2.2. Osteoporose .....	12
2.3. Fracturas .....	13
2.2.3.1. Causas das fracturas .....	13
2.2.3.2. Fractura do colo femoral.....	15
2.3. Factores intervenientes no metabolismo do <i>stress</i> .....	16
2.3.1. <i>Stress</i> .....	16
2.3.2.1. Glucocorticóides .....	17
2.3.2.2. Resposta Anti-inflamatória.....	18
2.3.2.3. Metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, e lípidos .....	18
2.3.2.4. Electrólitos e água .....	18
2.3.2.5. Efeitos colaterais provocados pelo excesso de GC <sub>s</sub> no organismo.....	19
2.3.3. Hormonas de crescimento .....	19
2.4. Comportamento do osso trabecular à compressão .....	20
2.4.1. Deformação elástica .....	22
2.4.2. Deformação plástica .....	22
2.5. Ensaio mecânicos .....	23
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>25</b>
Epidemiologia clínica.....	25
3.1. Camundongos Adultos .....	25
3.2. Quadro de <i>stress</i> .....	27
3.3. Exames efectuados .....	28
3.3.1 Análise densitométrica (DEXA).....	28
3.3.2. Ensaio Mecânicos .....	30

3.3.3. Histomorfometria .....	32
3.3.4. Imunoistoquímica .....	34
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>35</b>
Resultados e sua discussão .....	35
4.1. Resultados.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
4.2. Densitometria .....	37
4.3. Ensaio mecânicos .....	38
4.4. Histomorfometria .....	52
4.5. Imunoistoquímica .....	53
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>55</b>
Análise comparativa de influência do <i>stress</i> moderado crônico com animais de diferentes idades .....	55
5.1. Ratos jovens.....	55
5.2. Ratos Idosos.....	56
<b>Capítulo 6 .....</b>	<b>59</b>
Conclusões e Trabalhos Futuros.....	59
<b>Bibliografia.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>I</b>
Protocolo de imunohistoquímica utilizado no trabalho experimental .....	I
Cópia do certificado emitido pela Comissão de Ética para o uso de Animais da UFV .....	IV

## Lista de Figuras

Figura 1: Representação da estrutura do osso trabecular e cortical (adaptado de [6]). ....	4
Figura 2: Corte sagital de um osso longo [30]. .....	5
Figura 3: Esquema de ossificação intra membranar [9] .....	7
Figura 4: Esquema simplificado da remodelação óssea (adaptado) [34]. .....	8
Figura 5: Esquema à esquerda é uma representação do sistema RANK/RANKL/OPG. Pre OC-pré-osteoclasto, OB-osteoblasto, OC maduro-Osteoclasto maduro. Esquema à direita trata a relação entre os factores sistémicos e locais e o sistema RANK/RANKL/OPG. BMPs: proteínas morfogenéticas do osso; TGF- $\beta$ : factor de transformação do crescimento beta; PGs: prostaglandinas; CT: calcitonina; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos (adaptado de [34]). .....	9
Figura 6: Variação da massa óssea segundo o sexo e a idade [35]. .....	10
Figura 7: Pirâmide etária representativa do crescimento mundial em 1995, com previsões para o crescimento mundial no ano de 2025 [7]. .....	11
Figura 8: Comparação entre a matriz óssea de um osso saudável e com a de um osso osteopórico (adaptado de [6]). .....	13
Figura 9: Fractura do colo do fémur [6]. .....	15
Figura 10: Imagem à esquerda corte do fémur. Imagem à direita distribuição de tensões [6]. .....	21
Figura 11: Os três regimes de deformação do osso trabecular [6] .....	22
Figura 12: Aparelho de densitometria óssea (DEXA). .....	29
Figura 13: Calibração e obtenção de imagens no programa LUNAR ®. .....	29
Figura 14: Ossos dentro de uma tina com água, que simularia os tecidos moles. ....	30
Figura 15: Máquina universal de ensaio mecânico (EMIC®, DL3000) .....	30
Figura 16: Prato fixo e célula de carga. ....	31
Figura 17: Flexão da cabeça do fémur. ....	31
Figura 18: Teste de compressão da diáfise do fémur. ....	31
Figura 19: Área correspondente à energia absorvida até ao ponto de cedência [6]. ....	32
Figura 20: Blocos de parafina contendo os fragmentos ósseos. ....	33
Figura 21: Corte longitudinal da cabeça do fémur. ....	34



## Lista de Tabelas

Tabela 1: Quadro de <i>stress</i> sofrido pelos animais ao longo de 28 dias. ....	27
Tabela 2: Quantificação do número de amostras utilizadas para este trabalho. ....	28
Tabela 3: Tabela de pesos total de todos os animais em gramas. ....	37
Tabela 4: Resultados densitométricos. ....	38
Tabela 5: Ensaio mecânico da cabeça femoral. ....	47
Tabela 6: Ensaio mecânico da compressão da diáfise do fêmur ....	49
Tabela 7: Análise da espessura do osso cortical da diáfise ....	51
Tabela 8: Resultados obtidos através de histomorfometria. ....	53
Tabela 9: Protocolo de <i>stress</i> .....	55
Tabela 10: Resultados Densitométricos para ratos jovens [43].....	56
Tabela 11: Resultados densitométricos para ratos idosos [43].....	57



## Lista de Gráficos

Gráfico 1 Média de DMO.....	38
Gráfico 2: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento I, (cabeça femoral). .....	39
Gráfico 3: Curva força-deslocamento para machos com tratamento I, (cabeça femoral). .....	39
Gráfico 4: Curva força-deslocamento para machos com tratamento II, (cabeça femoral). .....	40
Gráfico 5: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento III, (cabeça femoral). .....	40
Gráfico 6: Curva força-deslocamento para machos com tratamento IV, (cabeça femoral). .....	41
Gráfico 7: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento V, (cabeça femoral). .....	41
Gráfico 8: Curva força-deslocamento para machos com tratamento IV, (cabeça femoral). .....	42
Gráfico 9: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento I (diáfise femoral). .....	43
Gráfico 10: Curva força-deslocamento para machos com tratamento I, (diáfise femoral). .....	43
Gráfico 11: Curva força-deslocamento para machos com tratamento II, (diáfise femoral). .....	44
Gráfico 12: Curva força-deslocamento para machos com tratamento III, (diáfise femoral). .....	44
Gráfico 13: Curva força-deslocamento para machos com tratamento IV, (diáfise femoral). .....	45
Gráfico 14: Curva força-deslocamento para machos com tratamento V, (diáfise femoral). .....	45
Gráfico 15: Curva força-deslocamento para machos com tratamento V, (diáfise femoral). .....	46
Gráfico 16: Módulo de elasticidade recorrendo a um ajuste linear na zona de comportamento elástico.....	47
Gráfico 17: Média do módulo de elasticidade e desvio padrão (N/mm <sup>2</sup> ). .....	48
Gráfico 18: Energia absorvida, obtida através da compressão da cabeça do fémur.....	49

Gráfico 19: Média do módulo de elasticidade da diáfise do fêmur.....	50
Gráfico 20: Energia absorvida até à cedência na compressão da diáfise femoral.....	51
Gráfico 21: Espessura do osso cortical.....	52
Gráfico 22: Diâmetro do canal medular.....	52
Gráfico 23: Variação do volume trabecular ósseo.....	53

## Lista de abreviaturas

A – Área

ACTH- Adrenocorticotrofina

BMPs- Proteínas morfogenéticas do osso

BV- Volume do osso

CMO- Conteúdo mineral ósseo

CT- Calcitonina

DMO- Densidade mineral óssea

E – Módulo de elasticidade (módulo de Young)

F – Força

GC's - Glucocorticóides

HHA- Hipotálamo-Hipófise-Suprarenais

IL- Interleucinas

M-CSF- Factor de estimulação de colónias de macrófagos

OPG- Osteoprotegrina

PGs- Prostaglandinas

PTH- Hormona paratiroideia

RANK- Receptor de activação do factor nuclear kB

RANKL- RANK ligando

TGF-b- Factor de transformação do crescimento beta

TV- Volume total

Wced – Energia absorvida

$\sigma$ - Tensão normal

$\sigma_{ced}$  – Tensão de cedência

$\sigma_{rot}$  – Tensão de ruptura

$\varepsilon$  – Deformação

$r^2$  – coeficiente de regressão linear



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Motivação e objectivo do trabalho

O comportamento mecânico do osso, nomeadamente a sua resistência óssea depende em grande parte das características densitométricas, micro-estruturais e geométricas das camadas trabecular e cortical [1].

Com o aumento da esperança média de vida dos indivíduos, as doenças ósseas como a osteoporose surgem mais frequentemente, levando muitas vezes ao aumento de fracturas, provocadas pela diminuição da densidade mineral óssea, (DMO). A estrutura óssea torna-se assim fragilizada devido à diminuição da espessura da camada cortical do osso, e também ao aumento da porosidade do osso trabecular [2].

A diminuição de massa óssea está normalmente associada à idade dos indivíduos e também ao seu estilo de vida, sendo assim, torna-se importante estudar qual a real influência do *stress* na perda de massa óssea, bem como a desregulação hormonal, tais como glucocorticóides e hormona de crescimento.

O estudo das propriedades ósseas sob o ponto de vista biológico e mecânico estão essencialmente ligadas às forças cíclicas que actuam in vivo no corpo humano [3].

O principal objectivo deste trabalho é obter através da análise de resultados biológicos e matemáticos, uma avaliação sobre a interferência do *stress*, com os diversos descontrolos hormonais e imunitários em animais adultos que terão variações em género idade e peso.

O estudo do comportamento ósseo em *Rattus norvegicus* pretende ser também um

delineamento, daquilo que pode ocorrer em seres humanos quando estão expostos a grandes emoções provocadas por *stress*, ou mesmo perturbações hormonais e imunitárias

## **1.2 Estrutura do Relatório**

Este relatório apresenta a seguinte estrutura:

No Capítulo 2 é efectuada uma introdução teórica do tema do trabalho, sobre as temáticas de *stress*, regeneração óssea, glucocorticóides, hormona de crescimento, e causas associadas à diminuição da massa óssea.

No Capítulo 3 é efectuada a descrição dos diferentes tipos de análises, bem como os métodos de trabalho utilizados para o processamento das amostras, dos quais se destaca: a densitometria óssea, ensaios mecânicos, histomorfometria e os exames de imunoistoquímica.

No Capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos nos diferentes exames e a respectiva análise.

No Capítulo 5 é feita a comparação dos dados obtidos com os dados de um trabalho anterior, em que com um protocolo semelhante foram feitas análises a dois grupos etários distintos, jovens e idosos.

No Capítulo 6 são expostas as conclusões obtidas com este trabalho experimental, bem como, sugeridas novas propostas para trabalhos futuros com relevância científica.

O manuscrito deste trabalho de pesquisa não foi efectuada de acordo com o novo acordo ortográfico da língua Portuguesa.

## Capítulo 2

### Estruturas ósseas e patologias associadas

O corpo humano é constituído por vários sistemas, sendo o sistema o esquelético responsável pela sustentação de todos os órgãos, tecidos moles, e respectiva protecção. O esqueleto acoplado com o sistema muscular é também responsável pela mobilidade do corpo.

Neste capítulo descreve-se a estrutura óssea e algumas patologias associadas.

#### 2.1 Ossos

O osso pertence ao tecido conjuntivo especializado (tecido ósseo), que constitui o esqueleto dos vertebrados, incluindo o ser humano, caracterizado pela sua elevada rigidez. O osso tem a capacidade de suportar uma grande quantidade de carga, as suas características plásticas e elásticas tornam-no o tecido ideal para o movimento e suporte de tecidos moles [25, 26].

Para além do suporte mecânico dos músculos e protecção dos órgãos vitais, o tecido ósseo, desempenha importantes funções biológicas, tais como, processo hematopoiese (produção de células sanguíneas na medula óssea), reserva de minerais (principalmente cálcio e fósforo), funcionando também como bloqueador ao absorver os sais alcalinos, mantendo o equilíbrio ácido-base no organismo [25].

A estrutura do osso consiste principalmente numa matriz óssea, na qual se distinguem dois tipos de componentes: a matriz orgânica e os constituintes minerais. A matriz orgânica consiste maioritariamente em fibras de colagénio tipo I, organizadas de forma

ordenada, que representam 95% de toda a matriz e são responsáveis pela elasticidade do tecido ósseo. Os restantes 5% da matriz óssea são compostos por proteínas diferenciadas como os proteoglicanos e glicoproteínas que são responsáveis pela mineralização óssea [9, 27]. Os constituintes minerais são maioritariamente iões de fosfato e de cálcio que formam a hidroxapatite. A hidroxapatite ligada com as fibras de colagénio é assim responsável pela grande resistência e rigidez óssea, porém quando o osso é descalcificado pode obter-se um tónus idêntico ao de tendões [9, 26, 27].

### 2.1.2 Diferentes tipos de tecido ósseo

O osso é constituído por dois diferentes tipos de tecido ósseo, sendo estes o osso cortical e o osso trabecular. O osso cortical é de estrutura compacta e constitui a camada externa de todos os ossos, representando percentualmente 80% da massa óssea total, sendo formado por secções sem cavidades, aspecto em anel com lamelas de fibras de colagénio, chamado de sistema haversiano como se verifica na Figura 1 [9].

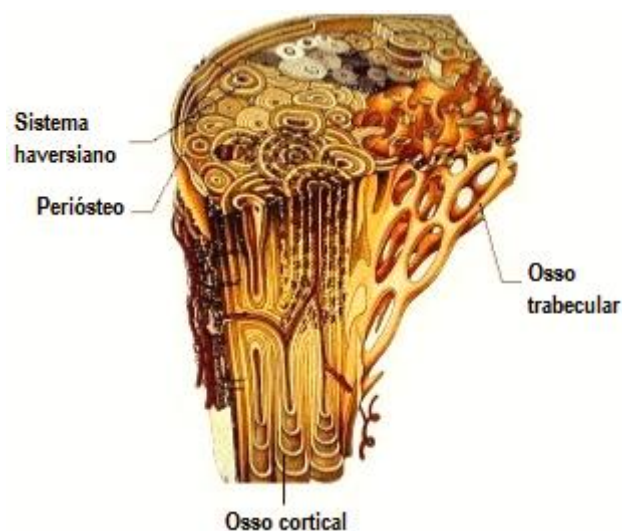


Figura 1: Representação da estrutura do osso trabecular e cortical (adaptado de [6]).

O osso trabecular ou também conhecido como osso esponjoso, consiste numa estrutura reticular porosa, com densidade variável e relativamente baixa, que confere

flexibilidade e resistência à estrutura óssea global. Estas propriedades advêm da sua capacidade de absorção de energia proveniente de impactos devido à arquitectura das cavidades porosas, (denominado de trabéculas), que mantém no seu interior a medula óssea. O osso trabecular, e devido à sua natureza, é ligeiramente mais elástico que o osso cortical [5, 9].

Para que o osso tenha capacidade de suportar o corpo do indivíduo, este tem de apresentar uma constituição perfeita entre as fibras de colagénio tipo I que se sobrepõem de forma helicoidal em três camadas e que com a conjugação de hidroxapatite conferem a rigidez característica do osso. Nas situações em que o osso é composto por demasiado colagénio, muitas vezes por desmineralização, apresenta características mais elásticas, podendo facilmente sofrer fracturas. Quando em situações de excessiva mineralização e baixa flexibilidade óssea na ocorrência de cargas, o osso apresenta elevado risco de fractura devido à fraca resposta dúctil [31].

Nos ossos longos, como o caso do fémur, a espessura de osso cortical nas extremidades (epífise) é pequena, sendo maior na diáfise [9].

Na Figura 2 pode observar-se o corte sagital de um osso longo bem como observar-se os principais elementos dos ossos.

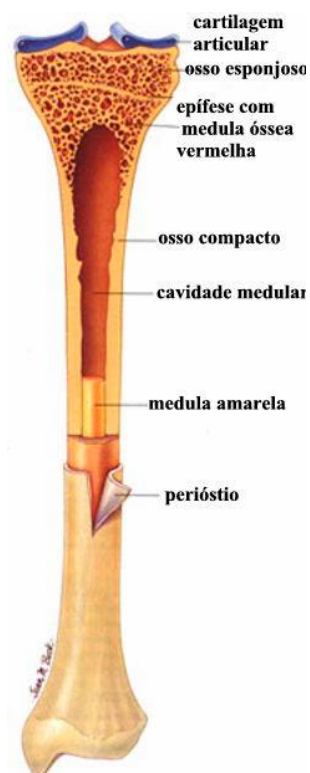


Figura 2: Corte sagital de um osso longo [30].

### 2.1.3 Remodelação óssea

Como referido anteriormente o osso é um tecido vivo, sendo que este está sempre em constante remodelação para manter as suas funções em pleno.

Existem quatro principais tipos de células ósseas que são responsáveis pela remodelação óssea, são estas: os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as *lining cells*. Contudo são os osteoblastos e os osteoclastos que estão mais intimamente ligados ao processo de remodelação óssea [9].

De uma forma generalizada, os osteoclastos são os responsáveis pela reabsorção do osso e os osteoblastos exercem o papel de construtores.

Nesse sentido, o processo de crescimento de um osso depende da acção conjunta de reabsorção de osso preexistente e da deposição de novo tecido ósseo. Esta acção conjunta é de extrema importância para o equilíbrio metabólico do cálcio e fósforo, e na reparação de micro-danos ósseos, que se acumulam ao longo do tempo [9].

#### 2.1.3.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea, através da capacidade de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que lembra um epitélio simples. Quando estas células estão em actividade intensa tomam a forma cubóide, a forma achatada é assumida quando os osteoblastos estão pouco activos. Uma vez incorporados dentro da matriz óssea, passam a ser osteócitos [9].

A matriz deposita-se ao redor do corpo da célula e dos seus prolongamentos formando assim as lacunas e canalículos. Os osteoblastos em fase de síntese mostram as características ultra-estruturais das células produtoras de proteínas. A matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos activos e que não está ainda calcificada, recebe o nome de osteóide [9].

Na Figura 3, podem ser observadas as estruturas responsáveis pela remodelação óssea, dentro dos quais os osteoblastos.

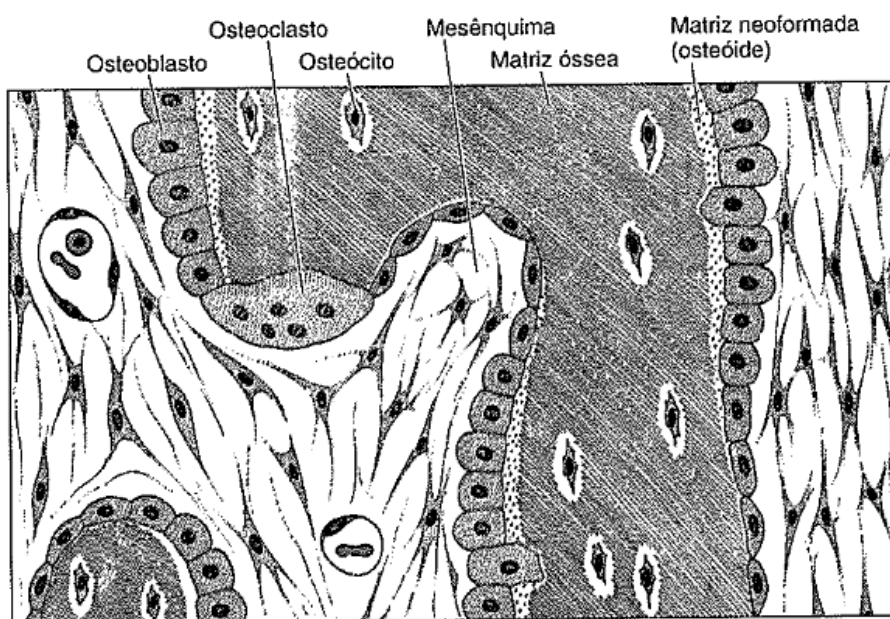


Figura 3: Esquema de ossificação intra membranar [9]

Para detectar a velocidade de formação óssea, podem muitas vezes ser administrados antibióticos, como o caso da Tetraciclina, que apresenta características de fluorescência. Devido à grande afinidade que este antibiótico tem com a matriz óssea podemos assim observar a actividade dos osteoblastos. Os resultados podem ser vistos após o decorrer de biopsias ósseas com recurso a microscópios de fluorescência [32, 33].

### 2.1.3.2. Osteoclastos

Os osteoclastos são células móveis, de grandes dimensões, e multinucleadas, resultando assim o seu núcleo da absorção de células mononucleares com ramificações muito grandes. As ramificações são irregulares, e com forma e espessura variáveis. São encontrados facilmente em zonas de reabsorção óssea, em depressões da matriz óssea, escavadas pela actividade dos osteoclastos, que tomam o nome de Lacunas de Howship [9].

Os osteoclastos têm citoplasma granuloso, algumas das vezes com presença de vacúolos. Estas células são originárias de precursores mononucleados provenientes da

medula óssea que, em contacto com o tecido ósseo, se unem para formar os osteoclastos multinucleados [9].

A superfície activa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares. A maioria desses prolongamentos tem a forma de folhas ou pregas que se subdividem. Circundando essa área com prolongamentos vilosos, existe uma zona citoplasmática, a zona clara, pobre em organelos, mas contendo muitos filamentos de actina. A zona clara é um local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea e cria um microambiente fechado, onde tem lugar a reabsorção óssea. Os osteoclastos segregam, dentro desse microambiente fechado, enzimas como colagenases e hidrolases que actuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de cálcio salino, que são libertados na corrente sanguínea [9, 22]. Pode ver-se na Figura 4 um esquema simplificado que explica a remodelação óssea.

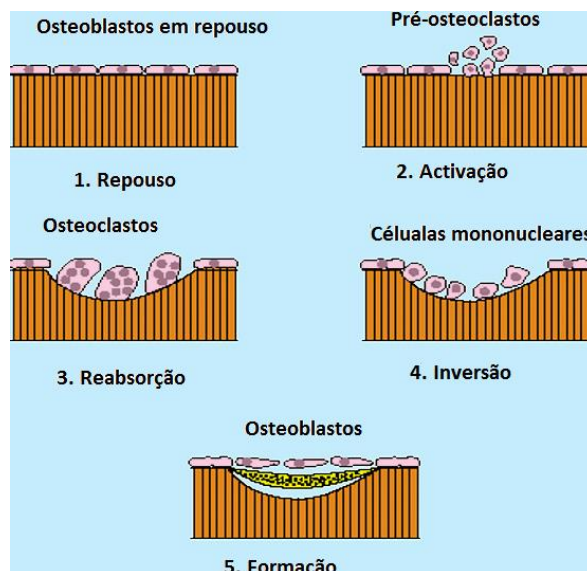


Figura 4: Esquema simplificado da remodelação óssea (adaptado) [34].

A actividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas (pequenas proteínas sinalizadoras que actuam localmente) e por hormonas como a calcitonina, uma hormona produzida pela tiróide, e a hormona paratiroideia, segregadas pelas glândulas paratireóides [10,22]. A regulação da osteoclastogénese, isto é, a diferenciação dos osteoclastos, é moderada pelo factor de estimulação das colónias de macrófagos (M-CSF) e pelo RANKL (ligando do receptor de activação do factor nuclear kB, RANK) produzido pelos osteoblastos. O RANKL liga-se ao RANK presente na membrana do osteoclasto, estimulando a diferenciação do precursor de osteoclastos em

osteoclastosque já sofreram maturação maduros. Deste modo em situação oposta, a osteoprotegerina (OPG), produzida pelos osteoblastos, bloqueia a formação de osteoclastos, ligando-se ao RANKL, com o qual tem grande afinidade, impedindo que este se ligue ao RANK e inibindo a osteoclastogénese [6, 21, 23].

O balanço entre a produção de RANKL e de OPG determina a quantidade de osso que é reabsorvida [6, 21, 23]. Existem outros agentes participantes neste processo, nomeadamente a hormona paratiroideia (PTH) e a vitamina D, que modelam o comportamento dos osteoblastos [6].

A PTH é segregada pelas glândulas paratiróides. A sua segregação é estimulada por baixas concentrações extracelulares de  $Ca^{2+}$ . A PTH aumenta a concentração plasmática de  $Ca^{2+}$ , estimulando a actividade dos osteoclastos, aumenta a absorção de cálcio intestinal, a absorção de vitamina D, e aumenta a reabsorção renal de cálcio. Isto traduz-se num incremento rápido e sustentado da quantidade de cálcio no sangue [11].

A PTH tem também influência na concentração sanguínea de fosfato, diminui a reabsorção renal de fosfato, o que impede os níveis de fosfato de aumentar quando a libertação de fosfato do osso aumenta [11]. Na Figura 5 pode observar-se um esquema onde todos os factores influenciam a regulação de osteoclastos e osteoblastos.

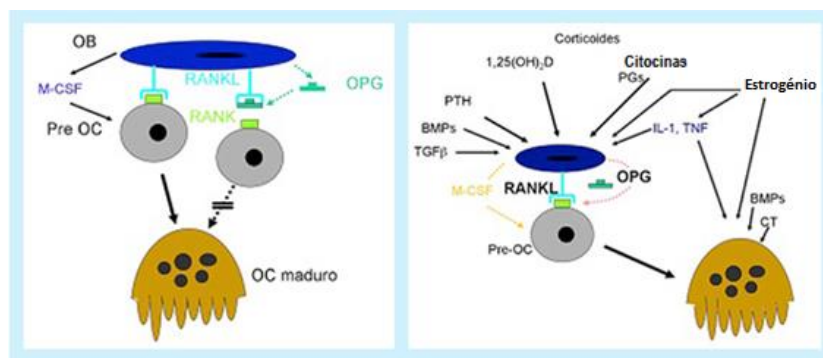


Figura 5: Esquema à esquerda é uma representação do sistema RANK/RANKL/OPG. Pre OC-pré-osteoclasto, OB-osteoblasto, OC maduro-Osteoclasto maduro. Esquema à direita trata a relação entre os factores sistémicos e locais e o sistema RANK/RANKL/OPG. BMPs: proteínas morfogenéticas do osso; TGF-β: factor de transformação do crescimento beta; PGs: prostaglandinas; CT: calcitonina; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

(adaptado de [34]).

A variação de massa óssea é um factor extremamente variável, sendo dependente da idade, sexo, histórico familiar, ou até mesmo de patologias próprias de cada indivíduo associadas ao seu estilo de vida [31]. Na Figura 6 observa-se um gráfico representativo das variações de massa óssea segundo a idade e o género. Como se pode observar o género masculino apresenta geralmente uma quantidade de massa óssea superior ao feminino, o pico de massa óssea acontece entre os 20 e os 30 anos sendo que após este período há gradualmente uma perda de massa óssea. As mulheres entre os 45 e os 60 anos começam a ter perda de massa óssea superior aos homens, factor que se explica devido à menopausa e à falta de estrogénios [20].

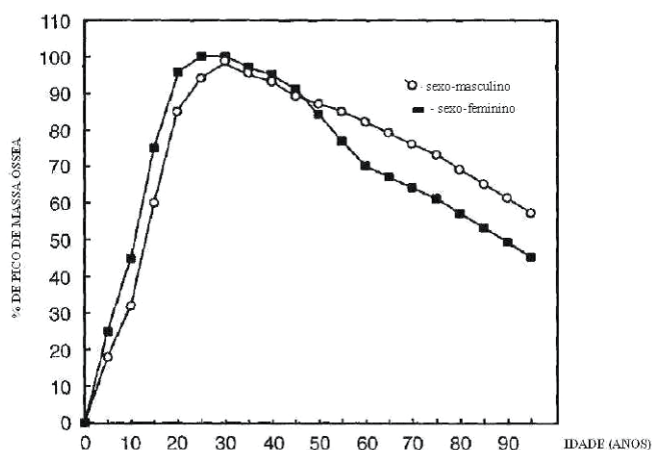


Figura 6: Variação da massa óssea segundo o sexo e a idade [35].

## 2.2. Causas associadas à diminuição de massa óssea

### 2.2.1. Envelhecimento

Como consequência de todos os avanços científicos, industriais e tecnológicos, a esperança média de vida tem vindo a aumentar nos últimos anos principalmente nos países mais desenvolvidos. Dentro desta análise podemos sinalizar o caso de Portugal em que a população idosa desde 1960 até 2011 aumentou 19% no seu total. Sendo assim, a população portuguesa vive em média mais 12 anos que à 51 anos atrás [7, 36].

Portugal encontra-se dentro dos 25 países do mundo com a população mais idosa sendo que no ano 2005, 15.9% da população total era idosa, com mais de 65 anos [8, 29].

Segundo as Nações Unidas, um indivíduo é considerado idoso no momento em que tem 60 anos de idade, porém na Europa segundo a União Europeia, uma pessoa é considerada idosa quando tem uma idade superior a 65 anos [7]. Como se verifica na Figura 7, a prospecção para 2025 apresenta uma pirâmide etária com bases mais estreitas e topos mais largos comparativamente com o ano de 1995. Sendo assim, a população será mais envelhecida, com uma menor taxa de natalidade.

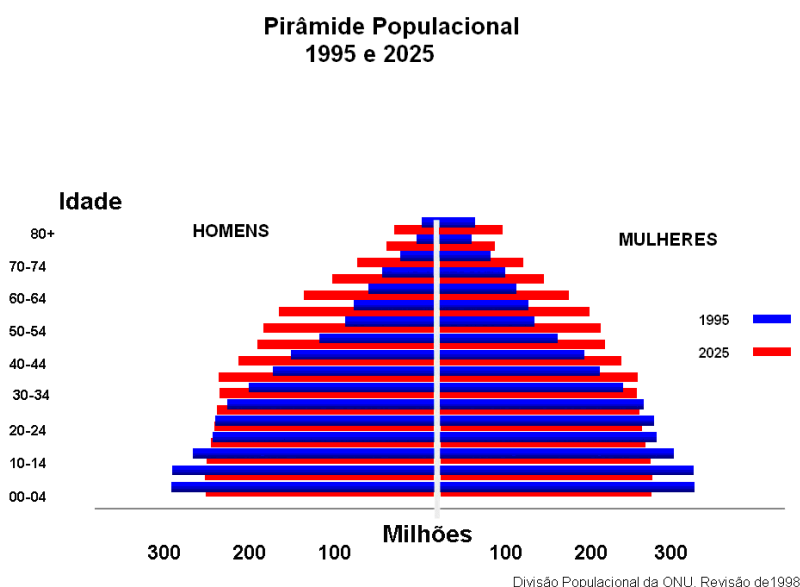


Figura 7: Pirâmide etária representativa do crescimento mundial em 1995, com previsões para 2025 [7].

No ano 2000 mais de metade da população mundial, considerada idosa habitava em países desenvolvidos (59% ou 249 milhões de pessoas). Em 2030, essa proporção deverá aumentar para 71% (686 milhões). Muitos dos países em desenvolvimento experimentaram ou estão a experimentar uma desaceleração significativa na sua taxa de crescimento natural da população, ou seja cada vez ocorrem menos nascimentos e cada vez menos mortes de indivíduos idosos, caso semelhante ao que ocorreu previamente nos países mais industrializados. Com o aumento da esperança média de vida a população será cada vez mais envelhecida [8, 7]. Com o aumento da esperança média de vida por parte da população idosa é natural que surjam doenças que antes não teriam tanto impacto na população, como é o caso da osteoporose. Esta doença não surge só como uma causa genética, mas também como um efeito do estilo de vida praticado por

cada indivíduo [6]. Com o envelhecimento, as células perdem a sua capacidade de regenerativa. No caso dos osteoblastos, responsáveis pela renovação celular óssea, a renovação celular não será à velocidade de quando o indivíduo ainda era jovem [3].

### **2.2.2. Osteoporose**

A osteoporose é uma doença metabólica caracterizada por uma grande perda mineral óssea, e à reduzida reposição dos componentes ósseos responsáveis por conceder resistência estrutural ao osso.

Existem factores de risco que favorecem o aparecimento desta doença, um dos mais relevantes é pertencer ao género feminino, por apresentarem uma DMO menor, e terem uma esperança média de vida superior [18]. O aparecimento de osteoporose no género feminino está em grande parte associado com o aparecimento da menopausa, nas idades entre os 45 e os 60 anos, com elevada perda percentual de osso trabecular, devido ao descontrolo hormonal [18, 19].

A redução dos níveis de estrogénio na menopausa influencia negativamente a massa óssea dado que o estrogénio tem um papel importante na absorção de cálcio, e influenciam a produção de IL-6, que é responsável pela osteoclastogénese, e por uma activação de monócitos e macrófagos que produzem outras citocinas, como a IL-1 e o TNF alfa. Tudo isto leva a uma diminuição da rigidez do tecido ósseo nos indivíduos do género feminino, sendo contrabalançado em parte, através da aposição de osso no perióstio, que é mais significativo no homem do que na mulher. Outro factor que leva a que o homem tenha menor taxa de incidência de osteoporose, é o facto de o esqueleto ser globalmente de maior porte, o que permite tolerar cargas superiores, e influenciar assim os ossos ao longo da vida, na formação de maior massa óssea, o que consequentemente diminui o risco de fractura [19]. Os indivíduos de etnia negra são menos propensos ao surgimento de osteoporose que os caucasianos e os asiáticos, visto possuírem uma maior DMO. A genética está também ligada à osteoporose, sendo que indivíduos pertencentes a famílias com incidência desta patologia podem apresentar predisposição para facilmente sofrer uma fractura osteopórica [18, 20].

Um estilo de vida sedentário, dieta com baixo teor de cálcio e vitamina D, tabagismo e ingestão frequente de grandes quantidades de bebidas alcoólicas, pode favorecer o aparecimento de osteoporose precocemente [19, 20]. Na Figura 8 encontram-se visíveis as diferenças entre um osso osteopórico e outro saudável.

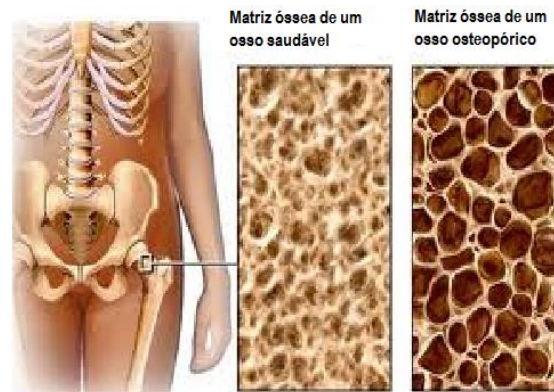


Figura 8: Comparação entre a matriz óssea de um osso saudável e com a de um osso osteopórico (adaptado de [6]).

### 2.3. Fracturas

Denomina-se por fractura a interrupção da continuidade óssea. As características da fractura podem depender do tipo e magnitude da carga sustentada, saúde do indivíduo e do estado em que o osso se encontra no momento da lesão. Existe assim uma grande quantidade de termos para qualificar os diferentes tipos de fracturas [18, 24].

As fracturas podem distinguir-se entre três principais tipos diferentes: fractura articular, que envolve a superfície articular de uma articulação; fractura fechada; e fractura exposta.

As fracturas fechadas são aquelas que ocorrem sem que haja qualquer dano para a pele ou em caso de existência de feridas, estas não contactam directamente com o foco da fractura, ao contrário da fractura exposta em que as feridas contactam directamente com a fractura e existe, devido à exposição, um grande risco de infecção [24].

#### 2.2.3.1. Causas das fracturas

As causas das fracturas podem ser bastante distintas. As fracturas traumáticas podem resultar de vários tipos de cargas, provocadas por um traumatismo violento exercido sobre um ou vários segmentos ósseos de forma indirecta ou directa. Fracturas por avulsão são causadas por forças de tração excessivas envolvendo um tendão ou

ligamento que tracciona uma pequena parte do osso para fora. Lançamentos e saltos extremamente impulsivos podem resultar em fracturas por avulsão do epicôndilo medial do úmero e do calcâneo [12, 24].

As fracturas de fadiga ou sobrecarga têm origem na repetição de cargas não traumáticas, que com a repetição da carga acabam por originar uma fractura. Este tipo de fracturas é frequente em atletas que efectuem treinos excessivos e que acabam por expor o seu corpo a cargas muito repetidas [18, 12, 24]. Em crianças existe também uma grande predisposição para fracturas ósseas, uma vez que devido à constituição óssea, os seus ossos são muito ricos em colagénio, e assim apresentarem uma elasticidade maior. Nesse caso as fracturas acabam por ocorrer de formas incompletas denominam-se de fracturas em ramo verde [24].

As fracturas que ocorrem normalmente em ossos longos, mais propriamente na diáfise, são fracturas que têm origem em cargas ou momentos de torção com energias excessivas, que consoante o seu ponto de aplicação podem ser transversais, oblíquas e segmentares. Um exemplo de fracturas de ossos longos é a fractura da diáfise da tibia em atletas de ski, que ocorrem em momentos curtos provocada por uma carga de tração excessiva provocando provavelmente uma fractura ou múltiplos fragmentos. Pelo facto deste tipo de osso ser mais forte e mais resistente a cargas de compressão, este tipo de fracturas traumáticas raramente ocorre na diáfise podendo ocorrer facilmente nas extremidades que são constituídas por maior quantidade de osso trabecular, que está mais propenso a este tipo de fracturas [9, 12, 24].

### 2.2.3.2. Fractura do colo femoral

São fracturas que têm localização na região compreendida entre uma linha rasante à base da cabeça e a linha basicervical, como se verifica na Figura 9. É denominada por fractura de tipo intercapsular, que devido à natureza da vascularização da cabeça do fémur, tem riscos de necrose muito elevados [24].

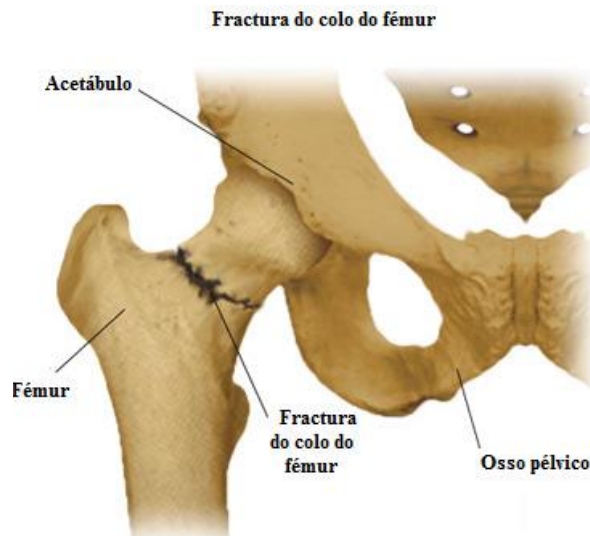


Figura 9: Fractura do colo do fémur [6].

Este tipo de fractura tem maior incidência em doentes idosos, geralmente do género feminino, que sofrem quedas, por vezes ligeiras, e estão intimamente associadas a casos de osteoporose. Este tipo de fracturas necessita de tratamento cirúrgico urgente, com fim a evitar a necrose e obtenção de maior possibilidade de tratamentos [24]. Devido ao risco de necrose é frequente que em indivíduos idosos se efectue a ortoplastia da anca, que permite uma deambulação precoce com apoio do membro [24].

## 2.3. Factores intervenientes no metabolismo do *stress*

### 2.3.1. *Stress*

O termo *stress* pode ser identificado quando existe um desequilíbrio entre as solicitações que são feitas a um determinado indivíduo, independentemente das circunstâncias, podendo ser do tipo físico ou psicológico, mas que o indivíduo não dispõe de recursos para poder responder a estas circunstâncias de melhor forma possível, gerando-se uma situação de *stress* [4,10].

Muito embora o *stress* seja apontado como um estado psicológico, acaba quase sempre por afectar a situação física do indivíduo.

Sendo assim verifica-se que o *stress* é mais agressivo para o indivíduo, tanto quanto menor for a sua exposição regular a situações de *stress*, sendo também que dependerá invariavelmente do factor psicológico de cada indivíduo para serem obtidas diferentes tipos de respostas à imposição de muitas solicitações [4].

Muitas vezes o *stress* dito como pontual não tem grande influência no comportamento do indivíduo, porém quando este é exposto a situações *stressantes* continuamente, pode sofrer danos físicos como psicológicos, acabando por assim mudar as suas práticas comportamentais [4].

A capacidade de cada indivíduo responder ao *stress* diminui com o aumento da idade, sendo assim os indivíduos adultos têm uma menor capacidade de resposta ao *stress* comparativamente com indivíduos mais jovens [10,14].

No momento em que o indivíduo é submetido a situações de *stress*, desencadeiam-se três fases que foram classificadas por Hans Selye como fase de alarme, fase de adaptação e a fase de resistência [5].

A fase de alarme é quando o indivíduo é exposto ao agente *stressante* e toma a decisão de como agir perante ele, é nesta fase que as glândulas endócrinas libertam hormonas que fazem aumentar o ritmo cardíaco, mantendo o corpo em estado de alerta, fazendo com que haja um câmbio da absorção nutricional por parte das células com maiores necessidades imediatas em vez de por todas as células [5].

A fase de adaptação é quando o organismo tenta recuperar dos danos causados na fase de alarme. A fase de resistência é a fase em que o organismo entra numa fase de

exaustão, sendo assim pode começar uma depleção metabólica e energética, e o organismo não estará pronto para responder a doenças que poderão advir [5].

Após muitas pesquisas sabe-se que quando o organismo é exposto a *stress* produz adrenalina pelas glândulas supra-renais, este mecanismo é só uma pequena parte do real mecanismo do complexo hipotálamo-hipófise-supra-renais (HHA) que produz hormonas com a responsabilidade de manter o equilíbrio homeostático [14, 17].

A parte vital do mecanismo do complexo HHA reside na estimulação do hipotálamo pelo mecanismo stressante, que por sua vez estimula a hipófise a segregar ACTH uma hormona chamada adrenocorticotrofina que estimulará as glândulas supra-renais a produzirem corticóides. Dentro dos quais os mais importantes são os glucocorticóides (GC<sub>s</sub>) que têm uma importante função no metabolismo [14-17].

Com o avanço da idade, observa-se um crescente desequilíbrio no complexo HHA, e conseqüentemente uma diminuição dos receptores de GC<sub>s</sub>, resultando assim num excesso de segregação de GC<sub>s</sub>, resultando numa degeneração do hipotálamo. O *stress* pode ser também responsável pela depressão imunitária, diminuindo a capacidade de resposta do organismo a pequenas infecções. [14].

### **2.3.2.1. Glucocorticóides**

Os glucocorticóides (GC<sub>s</sub>) são hormonas esteróides, derivadas do colesterol, produzidas pelas supra-renais, através de um mecanismo de activação pela segregação de ACTH, por parte da hipófise, recorrente de estimulações geradas por *stress* [17].

Os GC<sub>s</sub> atuam no controle de genes envolvidos na regulação de funções metabólicas, cardiovasculares e imunológicas. Esse efeito processa-se através do receptor nuclear de glucocorticóides, que é activado, transitoriamente, apenas após a exposição das células aos GC<sub>s</sub> [13, 15].

O termo "glucocorticóide" deve-se à acção dessas substâncias no metabolismo dos hidratos de carbono (açúcares). Quando se encontram no tecido muscular do indivíduo causam resistência à insulina, o que resulta numa menor captação de glucose e redução da síntese do glicogénio muscular. Sendo assim verifica-se uma inibição na síntese de proteínas e conseqüentemente um aumento do catabolismo proteico que resultam na hipotrofia da musculatura. Os aminoácidos mobilizados, a partir do tecido muscular, são

utilizados na gluconeogénese hepática. A resistência à insulina e o aumento na gluconeogénese, conjuntamente, resultam na hiperglicemia [13].

Os GC<sub>s</sub> têm assim como funções gerais actuarem como anti-inflamatórios e antialérgicos, inibindo qualquer tipo de resposta inflamatória. Provoca neutrofilia, linfopenia e inibem a fagocitose dos macrófagos e antagonizam a função vasodilatadora das bradcininas e da prostaglandina E no caso do metabolismo de proteínas, hidratos de carbono e lípidos, são responsáveis pela estimulação da neoglucogénese e inibe a captação de glucose por parte dos músculos, activa a lipólise provocando um aumento dos ácidos gordos livres no sangue bem como do glicerol, provocando hiperglicemia [13, 17].

#### **2.3.2.2. Resposta Anti-inflamatória**

Os GC<sub>s</sub> têm a capacidade de inibir a maioria dos componentes envolvidos no processo inflamatório, provocando neutrofilia, linfopenia, e inibem a fagocitose dos macrófagos, são responsáveis também pela antagonização das prostaglandinas E bradcininas, que têm função vasodilatadora [17, 37].

#### **2.3.2.3. Metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, e lípidos**

Os GC<sub>s</sub> estimulam a neoglucogénese, e inibem a captação de glucose pelos músculos, activam também a lipólise provocando um aumento de ácidos gordos e glicerol na corrente sanguínea; este tipo de alterações metabólicas pode provocar assim um drástico aumento da taxa de açúcares no sangue [17, 37].

#### **2.3.2.4. Electrólitos e água**

Todos os GC<sub>s</sub> promovem a perda de potássio por parte do sistema renal e aumentam a concentração de água no sistema sanguíneo. A retenção de sódio no sangue através dos rins é promovida pelos GC<sub>s</sub>, principalmente de origem natural, como é o caso do cortisol e da cortisona. A retenção de sódio por GC<sub>s</sub> sintéticos é quase inexistente, sendo que GC<sub>s</sub> como betametasona, triancinolona, e metilprednisolona promovem a excreção

de sódio, promovendo diminuição da pressão arterial. No caso do sistema nervoso central os GC<sub>s</sub> são responsáveis pelo aumento da excitabilidade do córtex frontal [16, 17].

#### **2.3.2.5. Efeitos colaterais provocados pelo excesso de GC<sub>s</sub> no organismo**

Os GC<sub>s</sub> são responsáveis pela disposição centrípeta do tecido adiposo, sendo que este se localiza de forma (taxio-escapulo-torácica) região abdominal [17].

O crescimento é um dos pontos que pode ser afectado também devido aos GC<sub>s</sub>, sendo bastante variável de indivíduo para indivíduo, bem como o seu tempo de uso, podendo provocar assim danos irreversíveis na altura final do indivíduo, e também na “idade” óssea [16, 17].

A toma de GC<sub>s</sub> aquando de uma infecção viral, irá diminuir a imunidade e uma possibilidade da progressão da infecção viral. Casos como varicela podem tornar-se mortais. Já no caso de infecções bacterianas como os GC<sub>s</sub> não têm grande influência na imunidade humoral, não se nota assim influência nas infecções bactérias [17].

Os GC<sub>s</sub> podem também ter influência na formação em pseudo-tumores cerebrais e alterações humorais, provocar o comprometimento renal, osteoporose e fractura vertebral. Quando a quantidade administrada de GC<sub>s</sub> é elevada e o período de exposição é elevado [17].

#### **2.3.3. Hormonas de crescimento**

O papel principal da hormona de crescimento (GH) durante a infância é promover o crescimento do osso, linear e continuamente, e provocar um crescimento saudável do indivíduo. A GH tem acção metabólica, não só durante a infância bem como ao longo da vida, sendo responsável pela decomposição dos açúcares e dos lípidos no sangue e principalmente transformar a energia dos alimentos em massa muscular [39]. Vários estudos afirmam que a GH é responsável por um aumento do metabolismo corporal, e também ósseo. Estudos *in vitro* mostram que a GH e a insulina têm grande afinidade com o factor de crescimento [40,41].

Os indivíduos com deficiência em GH (GHD), apresentam uma fraca reposição mineral

óssea e como apresentam dificuldades no metabolismo dos lípidos e na produção de insulina, desta forma pode já perceber-se que a GH não é só uma hormona que potencia o crescimento, mas que também é responsável pelo metabolismo [42]. Por exemplo, pacientes adultos ou jovens com GHD e comparativamente com indivíduos da mesma idade e género, apresentam DMO mais baixa que o indivíduo saudável. Além disso, estudos clínicos demonstraram que a prevalência de fracturas é 2,7 a 3 vezes mais elevada em pacientes com GHD do que nos indivíduos saudáveis. Os dados destes estudos indicam que o aumento do risco de fractura pode ocorrer muitas vezes devido à GHD, e não tanto a outros tipos de distúrbios da hipófise [42].

Alguns testes demonstram que a GHD pode ser revertida através de uma terapia de substituição com GH sintética, porém os resultados não são conclusivos. Em particular, no que se refere ao aumento de DMO os resultados inconclusivos, não se sabendo se a GH é responsável pelo aumento de DMO, uma vez que o que é bastante claro é que a GH é responsável pelo aumento do crescimento ósseo longitudinalmente [42]. No que respeita aos resultados do aumento ou diminuição do DMO, os resultados são bastante contraditórios, uma vez que tudo depende da idade, género, e grau de GHD [42].

#### **2.4. Comportamento do osso trabecular à compressão**

O estudo do osso trabecular é de grande importância tem inúmeras aplicações biomédicas tais como o estudo de fracturas, o comportamento biomecânico do esqueleto, e a construção de próteses ósseas. Este tipo de estudos visa procurar quais as geometrias e as características dos materiais que mais se adequam à construção das próteses, procurando evitar uma divergência entre o osso e o material da prótese que está a ser inserida no paciente [6].

O estudo do comportamento mecânico também é importante na percepção da perda de DMO, em pacientes com osteoporose ou com outro tipo de doenças ósseas, que apresentam sintomas relacionados com a resistência óssea, procurando assim prevenir fracturas [6]. O osso trabecular, tal como muitos outros materiais existentes in vivo, possui uma estrutura celular. A densidade das células depende da direcção das cargas que nela são aplicadas e também da intensidade, sendo que estes factores influenciam o formato destas células que se adaptem ao melhor suporte das tensões. Sabe-se também que quanto mais denso o osso trabecular mais resistência apresenta e consequentemente

menor probabilidade de fractura [6]. Na Figura 10 observa-se como se dá a distribuição celular na cabeça do fémur e a distribuições de forças. É interessante como a densidade de células se concentra mais onde as forças aplicadas são maiores.

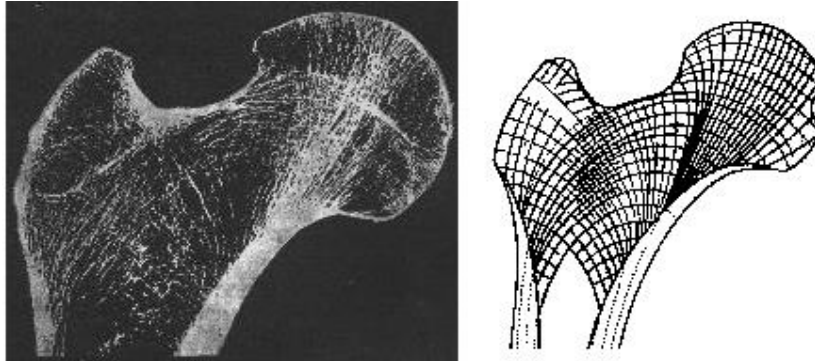


Figura 10: Imagem à esquerda corte do fémur. Imagem à direita distribuição de tensões [6].

A distribuição de tecidos trabeculares obedece à lei de Wolff. Segundo esta lei as trabéculas são orientadas de acordo com as tensões principais, permitindo que o osso obtenha a máxima eficiência mecânica com a mínima massa. A estrutura óssea pode adaptar-se em resposta à alteração dos estímulos mecânicos, [44]. É assim possível afirmar que existe uma maior densidade óssea em regiões que estão sujeitas a maiores tensões.

O comportamento mecânico do osso trabecular é típico de um material celular. A curva tensão-deformação ( $\sigma$ - $\epsilon$ ) apresenta três regimes distintos característicos dos materiais celulares: deformação elástica, deformação plástica e densificação, como se observa na Figura 11.

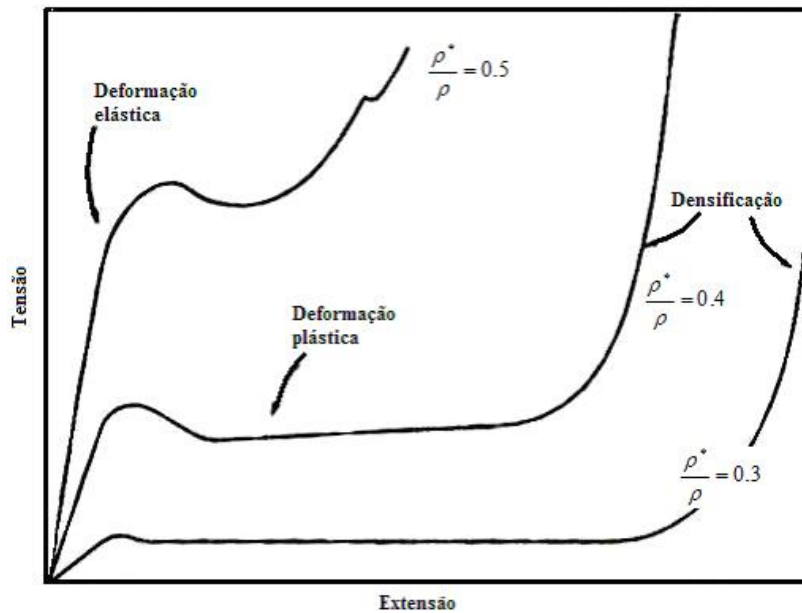


Figura 11: Os três regimes de deformação do osso trabecular [6]

#### 2.4.1. Deformação elástica

Numa deformação elástica quando é imposta uma força o material deforma a sua estrutura, mas após a eliminação de carga, a estrutura volta à forma anterior. Sendo assim pode-se dizer que a elasticidade é a capacidade de o material voltar à sua forma anterior quando a carga é removida. O declive da região elástica determina a rigidez da estrutura. No caso particular de uma curva  $\sigma-\epsilon$ , o declive é chamado módulo de elasticidade ou módulo de Young (E). O módulo de Young é independente do tamanho da amostra testada e é conseqüentemente uma medida da rigidez inerente ao material. A rigidez será, deste modo, a capacidade do material resistir à deformação. No entanto, para o osso trabecular não pode ser esquecida a sua falta de uniformidade entre trabéculas, bem como os constituintes que estão inerentes ao osso, tais como gordura, vasos sanguíneos, medula, entre outros. Sendo assim este material a ser estudado tem muitos graus de variabilidade, sendo que procura-se estudar a rigidez intrínseca a uma trabécula [6].

#### 2.4.2. Deformação plástica

O regime elástico termina quando as células que constituem a estrutura trabecular se

deformam, tensão à qual ocorre essa deformação é intitulada como tensão de cedência ( $\sigma_{ced}$ ), marcando a passagem para a zona de deformação plástica. Na zona de deformação plástica a estrutura não recupera a sua forma original, mesmo que a carga seja retirada, estando assim permanentemente afectada. Diz-se que um material pode sofrer uma maior ou menor extensão deformada, tanto quanto maior for a sua ductilidade [6].

### **2.4.3. Densificação**

Após uma grande deformação, acontece por último a densificação, onde as paredes das células entram em contacto entre si, verificando-se a compressão da estrutura trabecular. Neste ponto, a curva  $\sigma-\epsilon$  cresce de forma abrupta, visto ser necessário, um maior aumento da tensão aplicada para causar uma certa deformação na estrutura [6].

### **2.5. Ensaio mecânicos**

Os ensaios mecânicos em ossos são de grande importância para a compreensão do comportamento ósseo, visto serem uma estrutura biológica e o seu comportamento mecânico é inúmeras vezes irregular, existindo a necessidade de estudar a sua estrutura como um todo. Para que possam ser conhecidas as propriedades mecânicas do osso são muitas vezes utilizados ensaios mecânicos de compressão e de tracção. [6].

De um modo geral, pode afirmar-se que a compressão se trata de um esforço axial, que tende a provocar uma redução do corpo submetido a uma força. Este esforço axial representa a resultante das forças internas que se encontram distribuídas numa determinada área (A) [6].

A força por unidade de área, ou a intensidade das forças distribuídas sobre uma dada secção, é designada por tensão nessa secção e é denotada pela letra grega  $\sigma$ . A tensão num elemento de área A sujeita a um esforço axial F, é então obtida através do quociente do valor de F pela área A [6]:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

De acordo com os diferentes tipos de materiais, pode afirmar-se que obedecem a diferentes tipos de critérios.

No caso de serem dúcteis utilizem-se os critérios de tensão tangencial máxima ou de Tresca e o critério da energia da distorção ou Von Mises [45]. Ambos os critérios de Tresca e Von Mises estabelecem que a tensão limite de resistência é a condição limite. Para os materiais frágeis utiliza-se o critério da tensão normal máxima ou critério de Mohr. O critério de Mohr estabelece que não havendo, no caso de materiais frágeis, tensão de cedência, a tensão limite é a tensão de rotura, sendo a condição limite de resistência [45].

## Capítulo 3

### Epidemiologia clínica

Todos os procedimentos adoptados neste trabalho estão de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adoptados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, pelo processo 52/2009 (ver anexos).

#### 3.1. Camundongos Adultos

Para a produção deste trabalho experimental foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*), de ambos os sexos, sendo 25 machos adultos e 25 fêmeas adultas. Os animais foram adquiridos com idade entre 30 a 60 dias e mantidos no biotério do Laboratório de Reprodução do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, até completarem idade entre 11 a 12 meses, o que em humanos é equivalente a um indivíduo entre 30 e 40 anos.

Foram agrupados em gaiolas colectivas, sendo quatro machos por gaiola e cinco fêmeas por gaiola.

Estes animais foram divididos em cinco grupos, cada grupo com cinco machos e cinco fêmeas, nos quais é aplicado o protocolo de *stress* moderado crónico. Os grupos experimentais foram os seguintes:

**Grupo I:** animais controle, não têm limitações alimentares, e estão numa sala climatizada com luz e temperatura controladas.

**Grupo II:** animais submetidos a *stress* moderado crónico.

**Grupo III:** animais submetidos a *stress* moderado crónico associado a desafio imunológico, com Saponina, nos dias 21 e 28.

**Grupo IV:** animais submetidos a *stress* moderado crónico, desafio imunológico e estimulação do timo com Somotropina R durante os 28 dias do experimento numa proporção de 25 µg/kg por via subcutânea.

**Grupo V:** os animais pertencentes a este grupo, além dos tratamentos de *stress* e desafio imunológico, receberam uma dose semanal de cortisol, via intramuscular, na dose de 2mg/kg.

### 3.2. Quadro de *stress*

Na Tabela 1, é apresentado o quadro de *stress* moderado crónico, sofrido pelos animais ao longo de 28 dias.

Tabela 1: Quadro de *stress* sofrido pelos animais ao longo de 28 dias.

<b>Dia de Tratamento</b>	<b>Agente <i>stressante</i></b>	<b>GH</b>	<b>Duração</b>
1	Privação de Água	1° dose	12 h
2	Privação de comida noturna	2° dose	12h
3	Isolamento	3° dose	24h
4	Luz contínua	4° dose	24h
5	Imobilização	5° dose	20 min
6	Privação de água	6° dose	12h
7	Frio a 5°C	7° dose	2h
8	Isolamento	8° dose	24h
9	Privação de comida noturna	9° dose	12h
10	Sem stress	10° dose	24h
11	Luz contínua	11° dose	24h
12	Imobilização	12° dose	20min
13	Sem stresse	13° dose	24h
14	Isolamento	14° dose	24h
15	Privação de água	15° dose	12h
16	Sem stress	16° dose	24h
17	Inclinação da gaiola a 45°	17° dose	2h
18	Imobilização	18° dose	20min
19	Luz contínua	19° dose	24h
20	Isolamento	20° dose	24h
21	Calor a 33°C – desafio imunológico	21° dose	2h
22	Sem <i>stress</i>	22° dose	24h
23	Imobilização	23° dose	20min
24	Luz contínua	24°	24h
25	Privação de água	25° dose	12h
26	Privação de comida	26° dose	12h
27	Isolamento	27° dose	24h
28	Imobilização + desafio imunológico	28° dose	20min
29	<b>Eutanásia dos animais</b>		

No 29° dia após os animais serem eutanasiados, procedeu-se à colecta dos fémures, para

a execução de testes experimentais.

Os animais disponibilizados para a elaboração deste trabalho estão descritos na Tabela 2. Nesta tabela os animais estão dispostos por quantidades, sexos e tipos de tratamentos. Os animais estudados são consequência das quantidades disponibilizadas pelos Laboratórios de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 2: Quantificação do número de amostras utilizadas para este trabalho.

<b>Tipo de tratamento</b>	<b>Género</b>	<b>Quantidade de amostras</b>
<b>I</b>	Masculino	3
<b>I</b>	Feminino	2
<b>II</b>	Masculino	5
<b>III</b>	Feminino	4
<b>IV</b>	Masculino	4
<b>V</b>	Masculino	2
<b>V</b>	Feminino	6

### **3.3. Exames efectuados**

Para a obtenção dos resultados para este trabalho experimental foram efectuados exames de densitometria, ensaios mecânicos, imunohistoquímicos e de histomorfometria. A explicação de cada exame efectuado bem como a sua finalidade é demonstrado nos subcapítulos seguintes.

#### **3.3.1 Análise densitométrica (DEXA)**

Foram efectuadas densitometrias (Dual-Energy X-ray Absorptiometry) aos fémures, para que fosse possível calcular o conteúdo mineral ósseo (CMO (g)), a área do osso (cm<sup>2</sup>) no plano monodimensional, bem como a densidade mineral óssea (DMO (g/cm<sup>2</sup>)).

A fórmula que leva à obtenção de DMO é a seguinte:

$$DMO = \frac{CMO(g)}{Área (cm^2)}$$

Estes exames foram efectuados com o recurso a um aparelho Alpha DPX propriedade da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP/Araçatuba-SP, como se pode ver nas Figuras 12 e 13.



Figura 12: Aparelho de densitometria óssea (DEXA).



Figura 13: Calibração e obtenção de imagens no programa LUNAR ®

Os ossos são colocados dentro de uma tina com dois centímetros de água que simula a existência de tecido mole, como é possível ver na Figura 14.

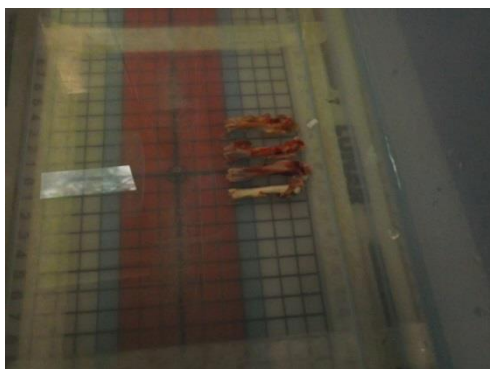


Figura 14: Ossos dentro de uma tina com água, que simularia os tecidos moles.

Para efeitos de padronização de dados o aparelho foi calibrado para efectuar o exame nas condições de um indivíduo do sexo masculino com altura de 1.70 metros e 70kg. As imagens foram obtidas no modo de alta resolução e após a digitalização das imagens foram delimitadas manualmente as áreas ósseas para cada amostra.

### 3.3.2. Ensaios Mecânicos

Os ensaios mecânicos nos fêmures foram efectuados na Faculdade de Odontologia da UNESP/Araçatuba – SP, com recurso a uma máquina universal de ensaios (EMIC®, DL3000) do Departamento de Materiais Dentários como se pode verificar na Figura 15.



Figura 15: Máquina universal de ensaio mecânico (EMIC®, DL3000)

A velocidade de carga aplicada foi de 5mm/min e a célula de carga de 2000N, com base num procedimento interno do laboratório. Na Figura 16 representa-se a estrutura com o prato fixo e a célula de carga. Foram efectuados dois tipos de testes, compressão da

cabeça do fémur e compressão de uma amostra da diáfise do fémur, como se verifica nas Figuras 17 e 18, respectivamente.



Figura 16: Prato fixo e célula de carga.

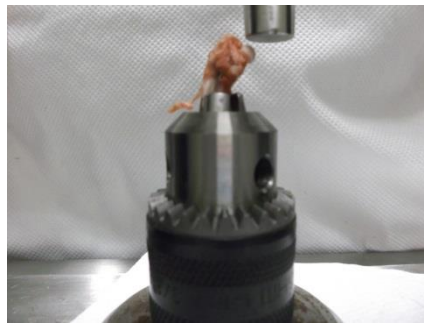


Figura 17: Compressão da cabeça do fémur

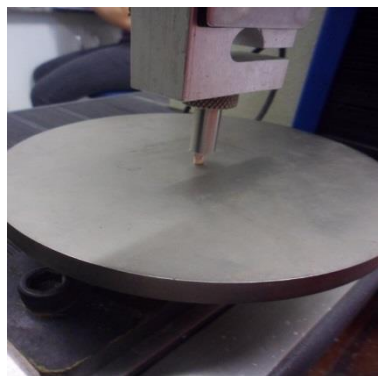


Figura 18: Teste de compressão da diáfise do fémur.

No caso do exame de compressão, o osso foi fixado verticalmente num suporte filatório, sendo que a carga foi aplicada sobre a cabeça do fémur como se pode observar na Figura 17. No caso do ensaio de compressão, foram cortados segmentos ósseos da diáfise do fémur, colocados verticalmente, sendo a carga aplicada como se pode observar na Figura 18.

Os dados obtidos foram trabalhados no Microsoft Office Excel 2010®, onde foi elaborada a curva força versus deslocamento para cada amostra. Na curva traçada foi determinada a zona linear para o cálculo da rigidez, através do maior ajuste de número de pontos a uma regressão linear confiável. O valor de  $r^2$ , coeficiente de regressão linear, para todos os pontos seleccionados foi maior que 0,999. O valor da regressão linear na fórmula  $y = ax + b$  representa a inclinação da recta, ou seja, o módulo de rigidez do osso.

Os valores obtidos relativamente à energia absorvida na zona elástica (ou resiliência), pelo osso são representados pela área do gráfico, obtida pelo cálculo da área abaixo da curva de cedência, como se pode observar na Figura 19.

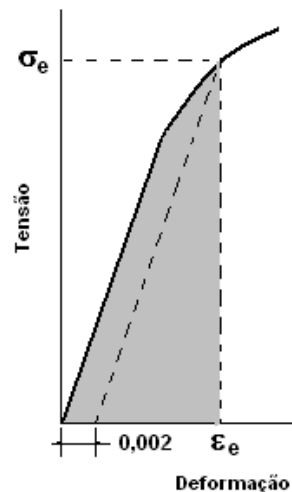


Figura 19: Área correspondente à energia absorvida até ao ponto de cedência [46].

Os valores obtidos com estes ensaios permitem determinar a resistência óssea.

### 3.3.3. Histomorfometria

Os fémures sofreram descalcificação numa solução descalcificante de citrato de sódio e ácido fórmico, que foi substituída a cada 4 dias. No final de duas semanas, os ossos encontravam-se suficientemente descalcificados para o processamento histológico. O material foi lavado em água corrente durante 6 horas. Em seguida, os ossos foram cortados em fragmentos menores para um processamento mais eficiente. Dos fémures,

foram retirados dois fragmentos transversais da diáfise. As epífises foram seccionadas longitudinalmente. O material foi processado e passado por álcool 70, 80, 90, 100 e 100%, por duas soluções de xilol e dois banhos de parafina. Em todas as soluções, o material foi mantido 60min. Em seguida, foram montados os blocos de parafina, cada um contendo um fragmento ósseo, como se pode ver na Figura 20.



Figura 20: Blocos de parafina contendo os fragmentos ósseos.

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo de rotação (Leica RM2245), com espessura de  $4\mu\text{m}$ . Foram colectados quatro cortes de cada amostra, tendo cada um pelo menos  $20\mu\text{m}$  de distância do outro.

Após permanecerem em estufa a  $56-60^{\circ}\text{C}$  durante toda a noite, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em concentrações decrescentes de álcool e em água, coradas em hematoxilina e eosina, e montadas com lamínula e bálsamo do Canadá. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E600) analisadas em programa computacional (Micrometrics SE Premium) após captura da imagem (Feldmann Wild Leitz Digi-Pro 5.0M).

O volume trabecular ósseo (BV/TV) foi avaliado no corpo das vértebras e na cabeça do fémur, pelo programa ImageJ® através do recurso ao cálculo de áreas. Nas lâminas analisadas, foram feitas fotomicrografias com o aumento de 100X para 4 zonas distintas da cabeça do fémur. O campo de observação para análise dos fémures foi determinado como um campo médio ao longo da linha de crescimento, porém abaixo desta, de forma a que não estivesse presente na imagem adquirida no aumento de 100X, abrangendo apenas osso trabecular. Pode visualizar-se na Figura 21 um exemplo do tipo de imagens capturadas e avaliadas.

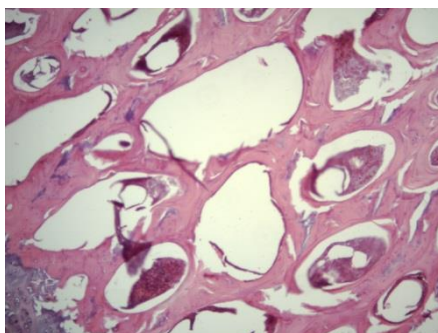


Figura 21: Corte longitudinal da cabeça do fémur.

O processamento histológico das amostras foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV; e a análise das lâminas, no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vectores no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agro-pecuária, na UFV (LBCHV/BIOAGRO-UFV).

#### **3.3.4. Imunoistoquímica**

Os exames de imunoistoquímica tem como objectivo detectar marcações positivas para OPG, RANK e RANK-L, e assim efectuar uma análise sobre a actividade dos osteoclastos e osteoblastos. Para que as lâminas fossem tratadas procedeu-se à execução de um protocolo de imunoistoquímica. Este protocolo poderá ser consultado em anexo.

## Capítulo 4

### Resultados e sua discussão

Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos com a realização de exames de DEXA, ensaios mecânicos, bem como a realização de exames histomorfométricos e de Imunoistoquímica.

Para efectuar este estudo os animais foram pesados antes de sofrerem qualquer tipo de protocolo sendo tomado o seu peso inicial (PI), e no final dos 29 dias os animais foram novamente pesados, sendo tomado o seu peso final (PF).

Com a comparação de PI e PF entre os indivíduos pode verificar-se que os animais que sofreram o tratamento I, mantém o mesmo peso ao longo dos 29 dias notando-se só uma ligeira subida de peso no caso do grupo de machos, embora não muito significativa. Nos grupos que sofreram os tratamentos II, III nota-se uma perda de peso, sendo que sofreram o tratamento IV; os indivíduos do sexo feminino aumentaram o seu peso ao contrário dos pertencentes ao sexo oposto. No caso dos animais que receberam o tratamento V, verifica-se um aumento de peso dos indivíduos de ambos os sexos, sendo o aumento de peso mais notório para os indivíduos do sexo feminino.

Na elaboração das tabelas procedeu-se à colocação do valor da média e o valor aproximado ( $\pm$ ) do desvio padrão em seguida.

#### 4.1. Pesagens

De acordo com os dados da Tabela 3, em todos os casos o peso inicial dos machos era superior ao das fêmeas, sendo este factor normal em mamíferos. Verifica-se para o caso dos animais que sofreram o tratamento I (controle) que os machos aumentaram ligeiramente o peso ao longo dos 28 dias sendo que nas fêmeas o peso foi mantido, havendo só uma perda de 0,2 gramas, valor que não é muito significativo. Os animais que sofreram o tratamento II (*stress*) tiveram perda de peso ligeiramente mais significativo no caso dos machos com 6,06% e 2,1% nas fêmeas, verifica-se também que para este tipo de tratamento e para ambos os sexos os desvios padrão são bastante elevados, indicando que mesmo dentro do mesmo sexo existem indivíduos que reagem de maneira bastante diferente.

Nos animais que sofreram o tratamento III verifica-se que em ambos os géneros existiu perda de peso, sucedendo que para este tratamento a perda foi mais significativa para o género feminino, sendo esta perda de 3,95% contra 0,85%, verificando-se assim que as fêmeas foram mais afectadas por este tipo de tratamento, no entanto verifica-se mais uma vez elevados desvios padrão para o caso dos machos que indica que nem todos eles reagem da mesma forma ao tratamento.

No caso do Tratamento IV (com GH) existe uma perda de peso nos machos, cerca de 4% do seu peso inicial, contra um aumento de peso das fêmeas de 14%, no caso das fêmeas pode ver-se que o desvio padrão baixou o que indica que os seus pesos se tornaram mais homogéneos. No tratamento V, verifica-se que para ambos os sexos houve um aumento de peso sendo que para as fêmeas é mais evidente que para os machos.

Tabela 3: Tabela de pesos total de todos os animais em gramas.

Tratamento	Machos		Fêmeas	
	Peso inicial (PI) Média e desvio padrão	Peso final (PF) Média e desvio padrão	Peso inicial (PI) Média e desvio padrão	Peso final (PF) Média e desvio padrão
I	430,6 ± 25,8	439,4 ± 38,5	329,7 ± 7,3	329,4 ± 12,7
II	394,8 ± 44,3	378,8 ± 39,5	291,4 ± 43,7	285,3 ± 42,5
III	402,0 ± 61,4	399,0 ± 58,2	261,4 ± 17,0	251,1 ± 19,0
IV	500,7 ± 45,3	480,7 ± 43,5	270,6 ± 23,9	309,4 ± 8,7
V	410,6 ± 56,8	426,4 ± 55,9	266,3 ± 9,7	310,4 ± 16,2

## 4.2. Densitometria

Os resultados obtidos para os exames de DEXA estão representados na Tabela 4. A diferença entre os valores é significativa. De acordo com a tabela pode observar-se que os machos apresentam uma DMO superior à das fêmeas, algo que já era expectável pois trata-se de uma diferença que está ligada ao género.

De acordo com os dados pode ver-se que o tratamento II fez baixar a DMO dos machos, ou seja apesar da perda de peso, estas acabaram também por perder massa óssea, em comparação com o grupo de controlo.

O grupo que sofreu o tratamento III perdeu também DMO relativamente ao grupo de controlo, por falta de dados não se sabe qual a influência nesta perda de DMO pela saponina. No grupo que sofreu o tratamento IV notou-se um aumento da DMO, comparativamente com o grupo de machos que sofreu o tratamento I, nesse caso pode dizer-se que os resultados actuais estão de acordo com outros estudos que afirmavam este mesmo facto para a hormona GH.

O grupo que sofreu o tratamento V nota-se uma grande perda de massa óssea em ambos os sexos, sendo mais evidente para os machos que perderam cerca de 6,02% de DMO, e para as fêmeas 4,16%.

Tabela 4: Resultados densitométricos.

<b>Grupo:</b>	<b>Média de CMO (g) e desvio padrão</b>	<b>Média de área (cm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>	<b>Média DMO (g/cm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>
<b>Fêmeas I</b>	0,3400 ± 0,0127	1,8930 ± 0,1598	0.1805 ± 0,0219
<b>Machos I</b>	0,4348 ± 0,0343	2,1292 ± 0,1537	0,2046 ± 0,0132
<b>Machos II</b>	0,3643 ± 0,0535	2,1247 ± 0,1881	0,1713 ± 0,0121
<b>Fêmeas III</b>	0,3542 ± 0,0488	2,0590 ± 0,3428	0,1698 ± 0,0259
<b>Machos IV</b>	0,5644 ± 0,1040	2,5670 ± 0,2199	0,2188 ± 0,0262
<b>Fêmeas V</b>	0,3510 ± 0,0070	2,0960 ± 0,0890	0,1730 ± 0,0042
<b>Machos V</b>	0,3298 ± 0,0475	1,7535 ± 0,1196	0,1923 ± 0,0250

A análise dos valores médios de DMO podem ser visualizados também no Gráfico 1, onde é possível observar os valores correspondentes ao desvio padrão.

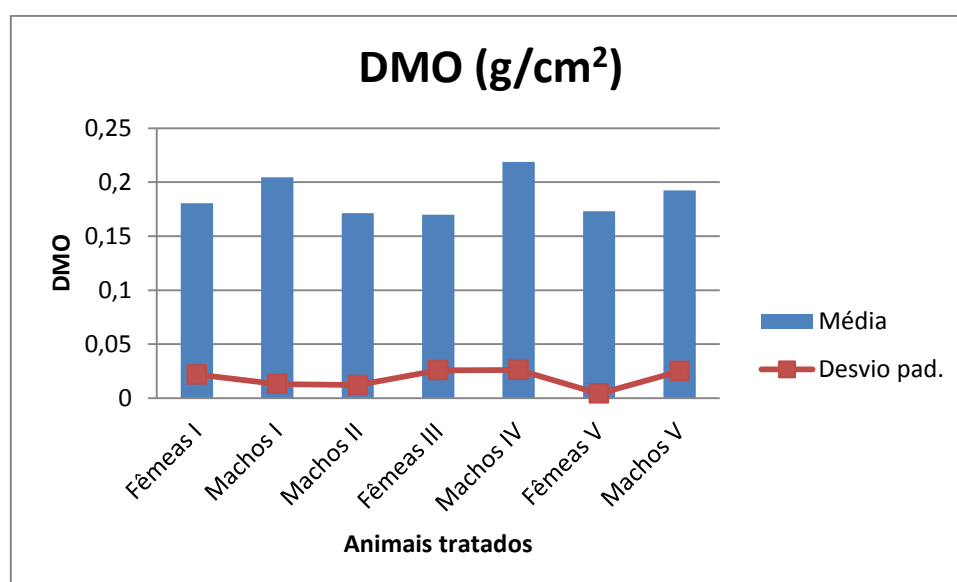


Gráfico 1 Média de DMO

### 4.3. Ensaio mecânicos

Com a realização de ensaios mecânicos da compressão da cabeça femoral, foi possível obter os Gráficos 2 a 8, em que estes representam as curvas força-deslocamento obtidas, para cada grupo de animais estudados e respectivo tratamento. Com a análise dos gráficos observa-se a uniformidade dos dados obtidos, bem como o comportamento

ósseo à compressão mecânica.

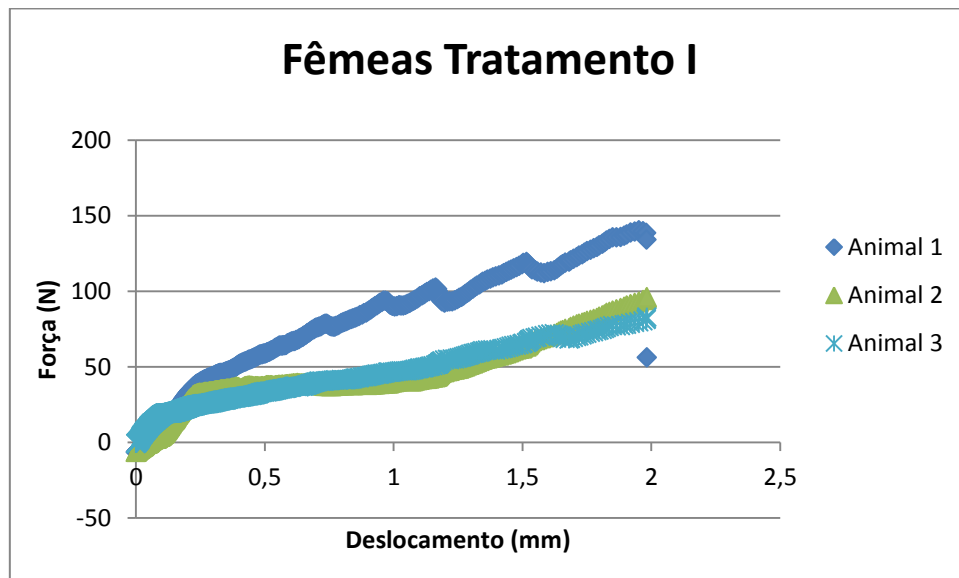


Gráfico 2: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento I, (cabeça femoral).

No Gráfico 2 pode observar-se que o Animal 1 tem valores mais díspares dos restantes elementos do grupo. No Animal 1 notam-se ligeiras irregularidades na curva força-deslocamento, que ocorreram no momento do ensaio mecânico.

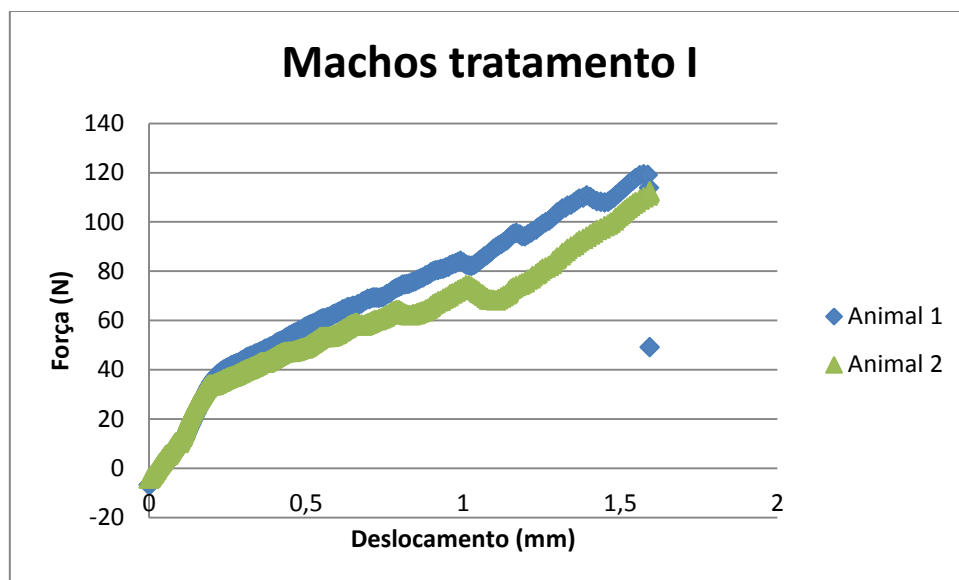


Gráfico 3: Curva força-deslocamento para machos com tratamento I, (cabeça femoral).

No Gráfico 3 pode observar-se a homogeneidade dos dados de ambos os animais durante a fase elástica do exame ósseo.

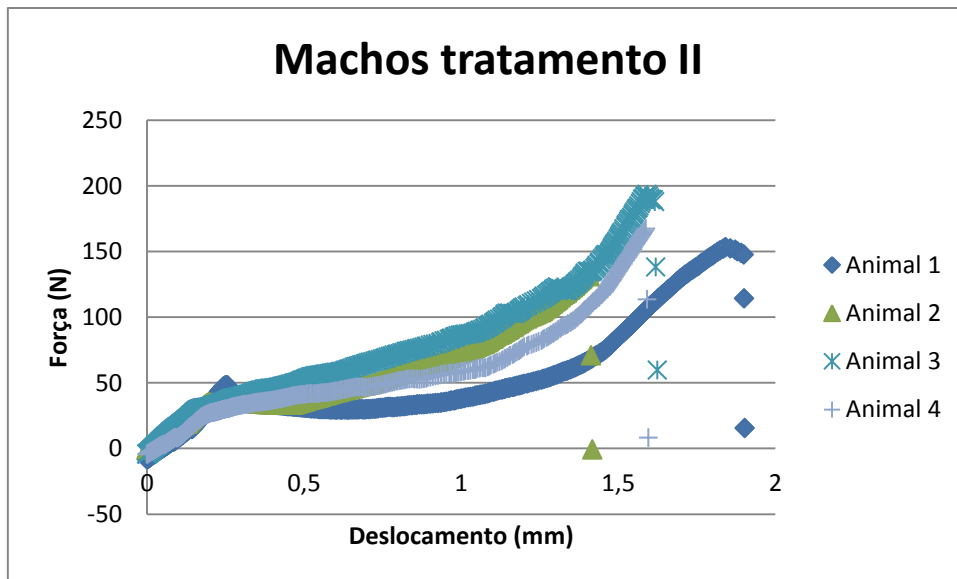


Gráfico 4: Curva força-deslocamento para machos com tratamento II, (cabeça femoral).

Observa-se no Gráfico 4, homogeneidade relativamente à fase elástica do ensaio mecânico para os animais que sofreram o tratamento II, relativamente ao género masculino. O gráfico demonstra ligeiras variações entre os valores que cada um dos animais apresenta através das curvas força-deslocamento na cabeça do fêmur.

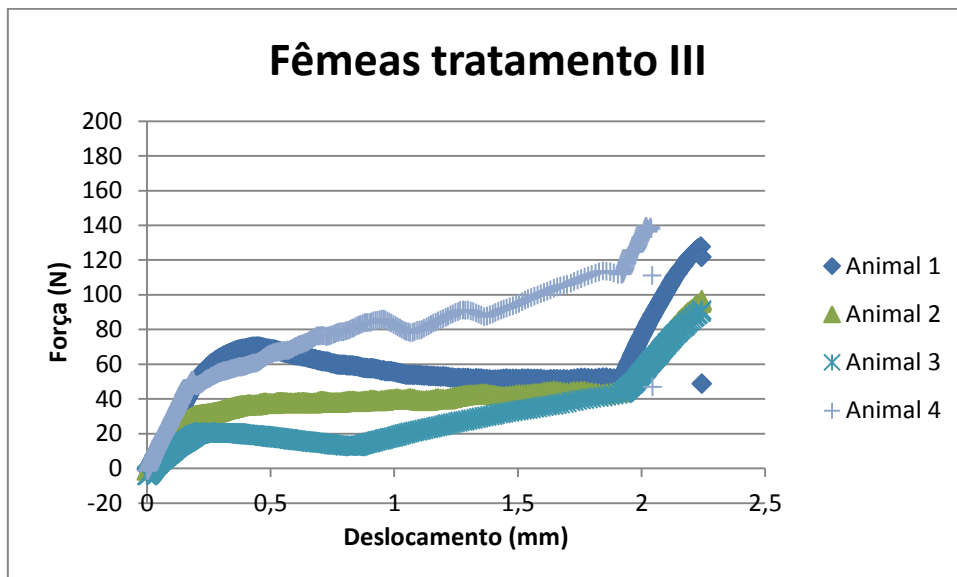


Gráfico 5: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento III, (cabeça femoral).

No Gráfico 5 observa-se pouca homogeneidade das curvas força-deslocamento, para o tratamento III em fêmeas.

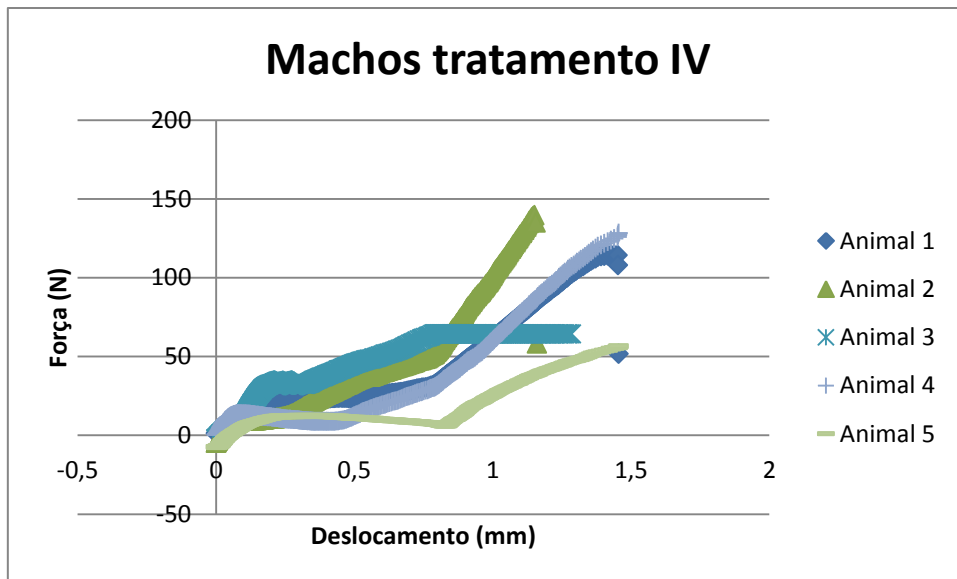


Gráfico 6: Curva força-deslocamento para machos com tratamento IV, (cabeça femoral).

No Gráfico 6 pode observar-se as diferenças entre os valores da curva força-deslocamento para cada indivíduo que sofreu o tratamento IV.

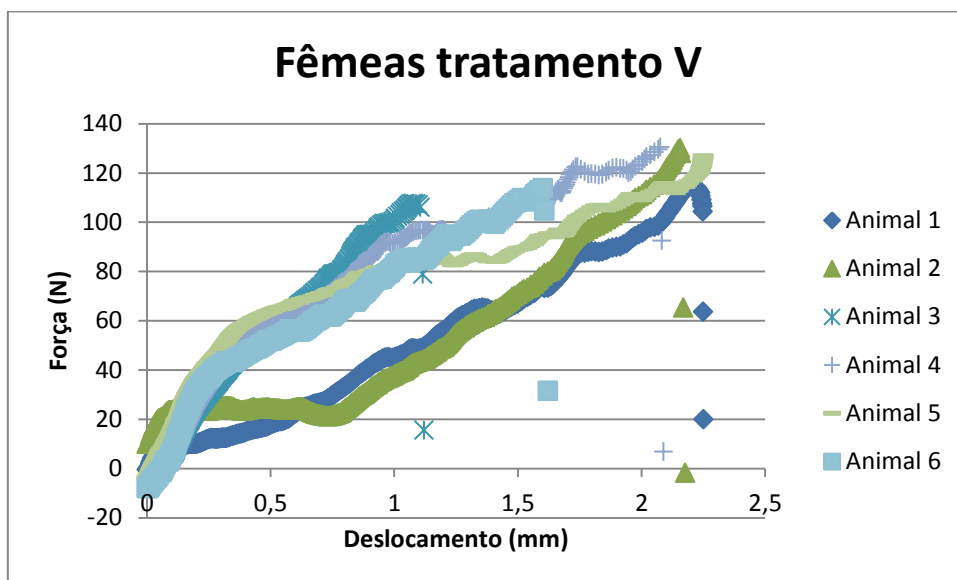


Gráfico 7: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento V, (cabeça femoral).

Nos Gráfico 7 podem observa-se as curvas força-deslocamento para o tratamento V em fêmeas e a suas diferenças entre os animais do mesmo grupo.

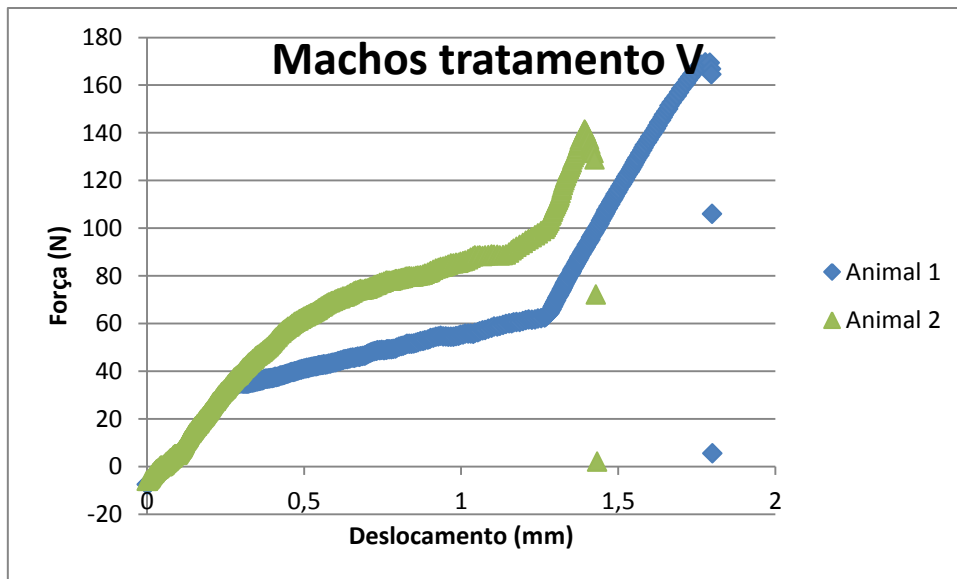


Gráfico 8: Curva força-deslocamento para machos com tratamento IV, (cabeça femoral).

No Gráfico 8 pode observa-se a homogeneidade de valores entre os animais no início da fase elástica para as curvas força-deslocamento.

Nos gráficos anteriores é possível observar que em alguns grupos existem grandes diferenças entre animais dos mesmos grupos, este facto pode ser justificado pela falta de homogeneidade entre a população de animais, e também pelas condições de hidratação óssea no momento do ensaio mecânico.

Nos ensaios mecânicos para a diáfise femoral, obtiveram-se os Gráficos 9 a 15, em que pode observar-se o tipo de curva força-deslocamento obtida, a partir das quais se registará o módulo de elasticidade e o restante comportamento mecânico ósseo à compressão.

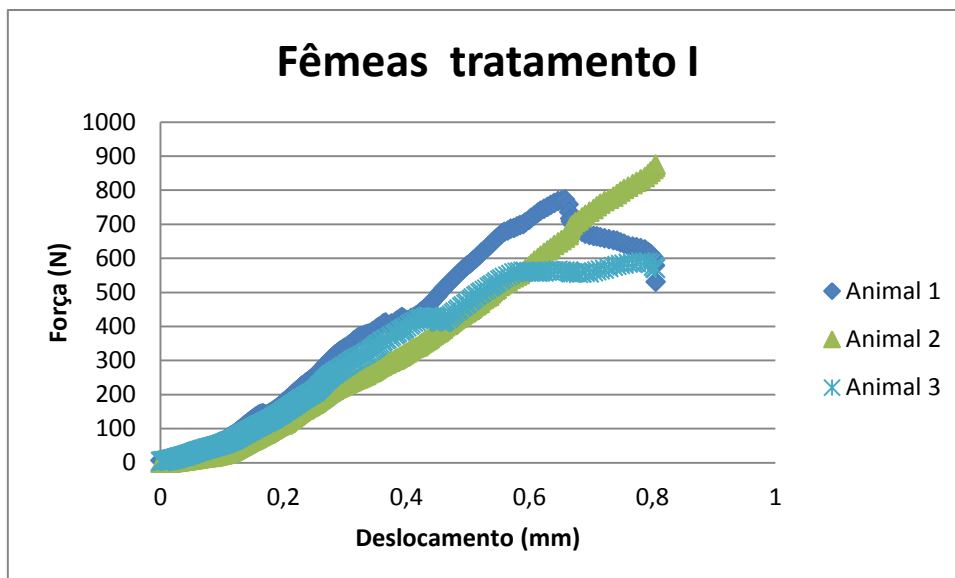


Gráfico 9: Curva força-deslocamento para fêmeas com tratamento I (diáfise femoral).

No 9 nota-se a uniformidade entre os valores das curvas força-deslocamento para os animais do género feminino que sofreram o tratamento I para o caso da diáfise femoral.

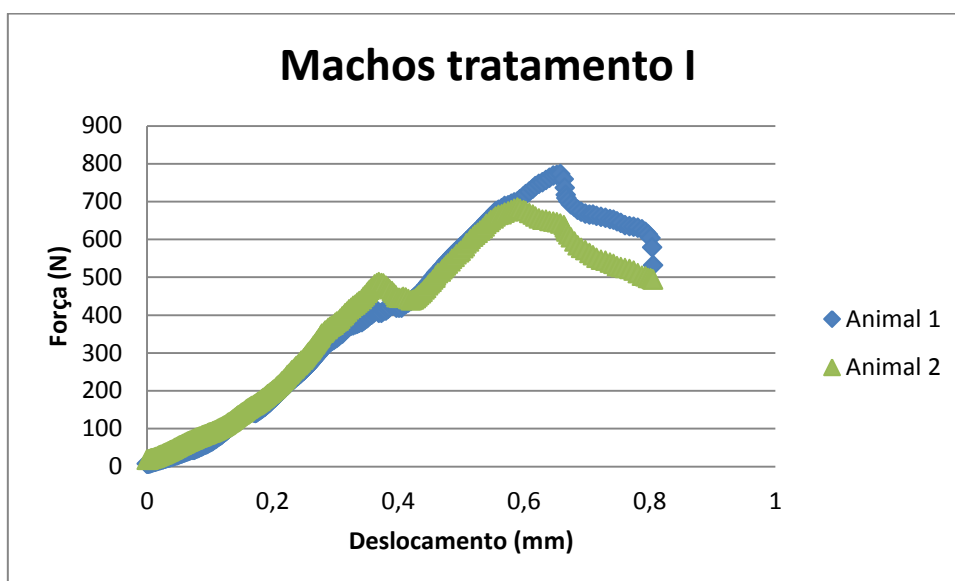


Gráfico 10: Curva força-deslocamento para machos com tratamento I, (diáfise femoral).

No Gráfico 10 observa-se uniformidade entre o comportamento ósseo para ambos os animais do mesmo grupo.

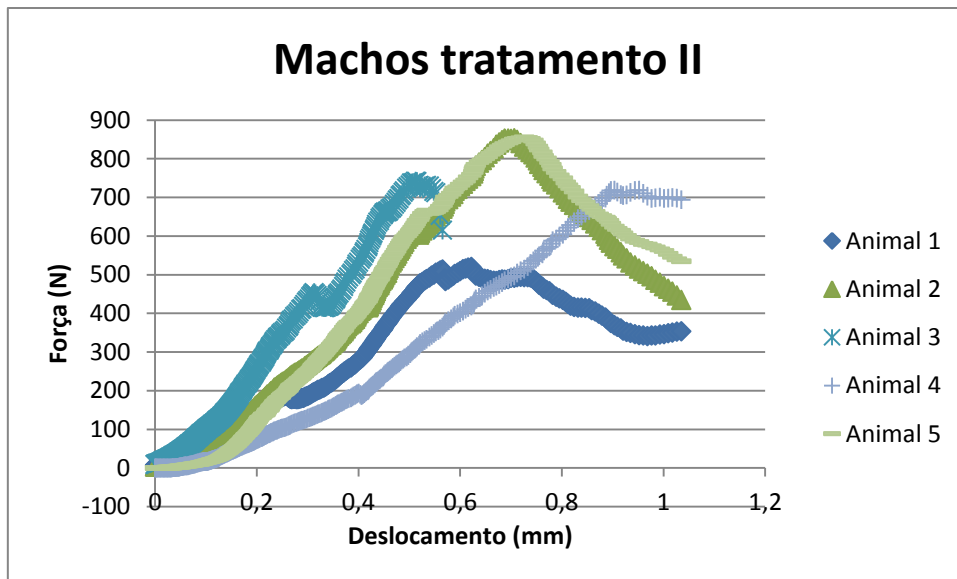


Gráfico 11: Curva força-deslocamento para machos com tratamento II, (diáfise femoral).

No gráfico 11 está patente a falta de semelhança entre os valores tomados pelas curvas força-deslocamento entre os vários animais do género masculino que sofreram o tratamento de *stress*.

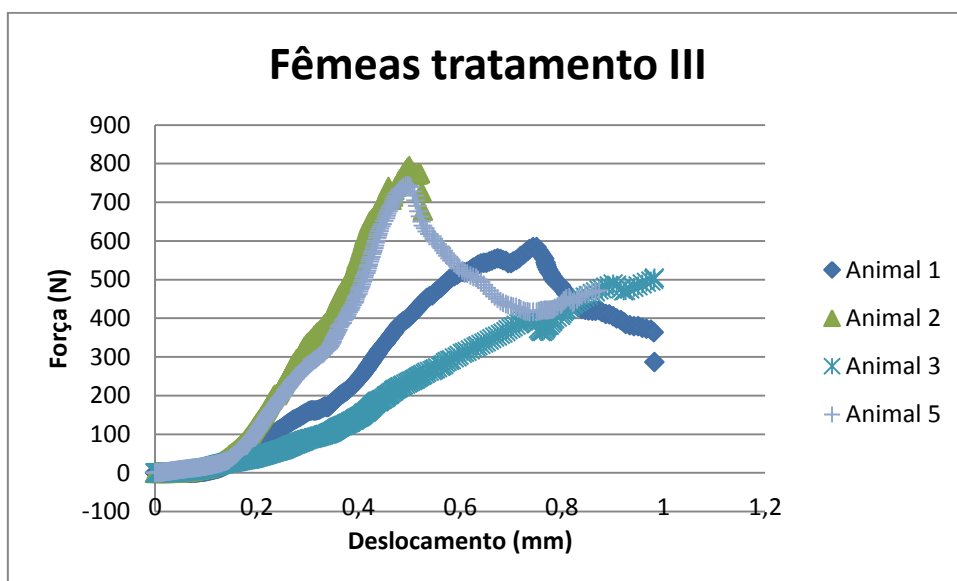


Gráfico 12: Curva força-deslocamento para machos com tratamento III, (diáfise femoral).

No gráfico 12 nota-se a homogeneidade entre dois dos animais do grupo que sofreu o tratamento III, em comparação com os restantes animais.

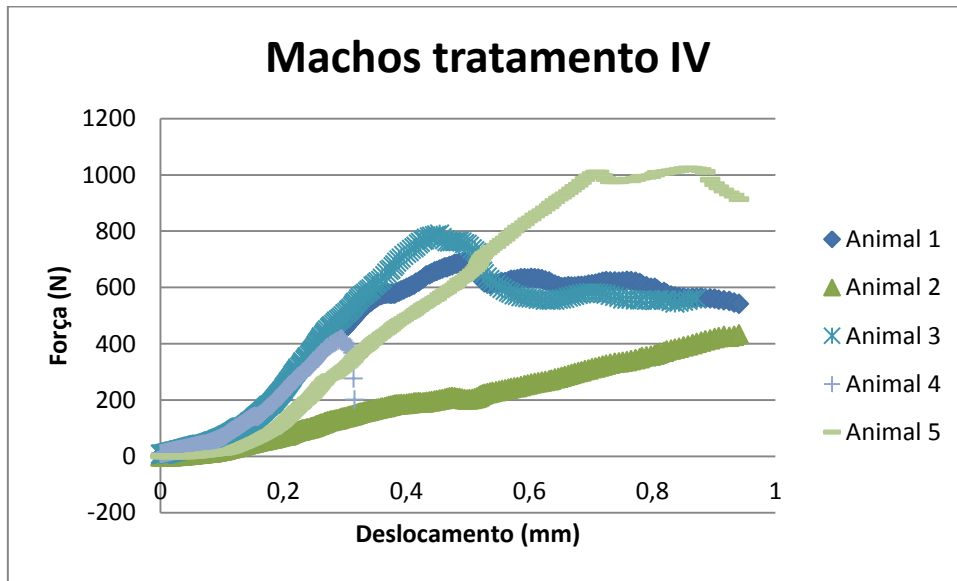


Gráfico 13: Curva força-deslocamento para machos com tratamento IV, (diáfise femoral).

Com a análise do Gráfico 13, pode observar-se os diferentes valores tomados para o grupo de machos que sofreu o tratamento IV e o seu comportamento relativamente à força aplicada e ao deslocamento sofrido.

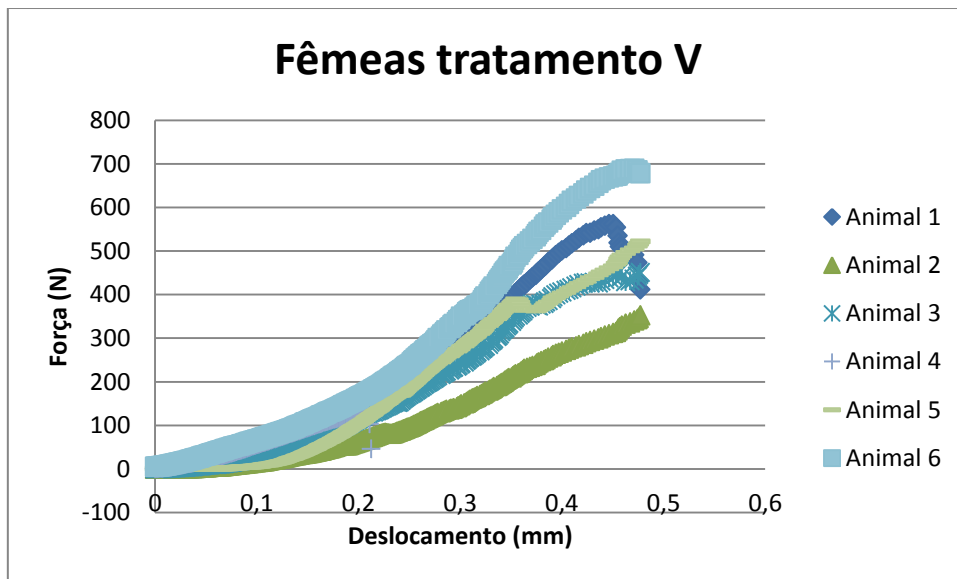


Gráfico 14: Curva força-deslocamento para machos com tratamento V, (diáfise femoral).

No Gráfico 14 verifica-se a homogeneidade de valores que as fêmeas que sofreram o tratamento V apresentam na fase elástica do ensaio mecânico.

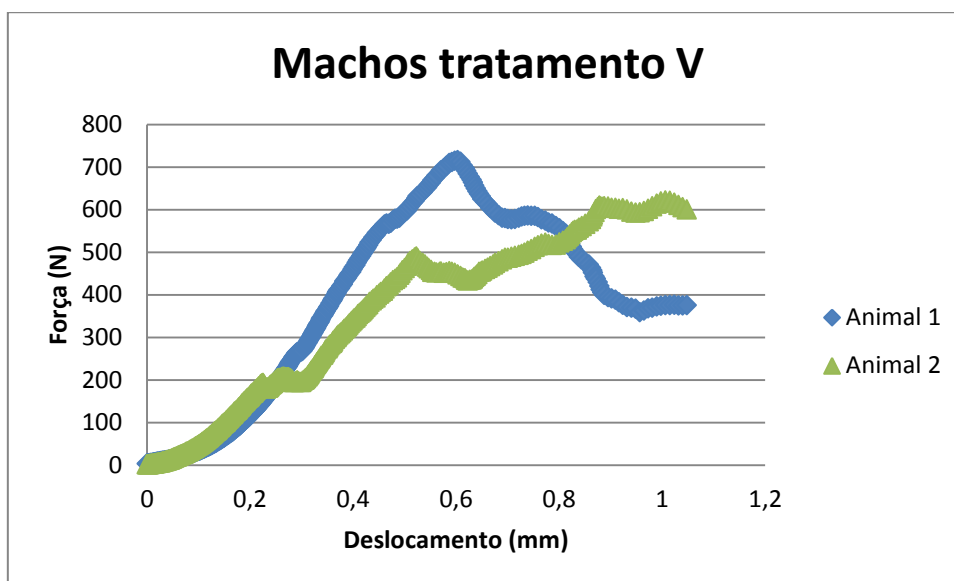


Gráfico 15: Curva força-deslocamento para machos com tratamento V, (diáfise femoral).

No gráfico 15 podem observar-se as curvas força-deslocamentos para o caso dos machos que sofreram o tratamento V, e é notória a diferença entre o comportamento ósseo dos dois animais que pertencem a este grupo.

Com a leitura dos gráficos anteriores, é notório que dentro dos mesmos grupos, existem valores que têm grande disparidade dos do restante grupo, este facto pode dever-se à possível desidratação dos ossos no momento do ensaio mecânico.

Para a obtenção do módulo de elasticidade procedeu-se à regressão linear na zona de comportamento elástico da curva  $\sigma$ - $\epsilon$ , dos gráficos apresentados anteriormente, considerando-se o declive da equação fornecida como sendo o módulo de elasticidade, Gráfico 16.

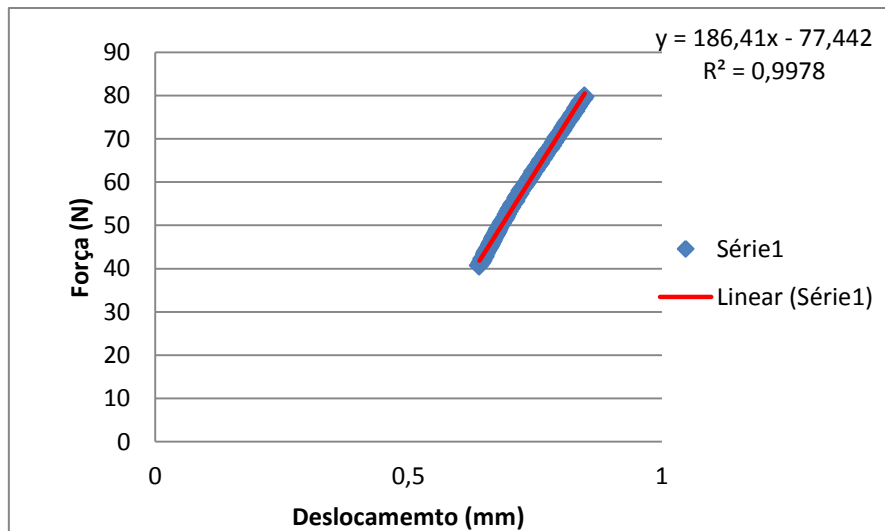


Gráfico 16: Módulo de elasticidade recorrendo a um ajuste linear na zona de comportamento elástico.

Na tabela 5 pode ver-se os resultados do ensaio mecânico da cabeça do fémur onde é calculado o módulo de elasticidade e a energia absorvida.

Tabela 5: Ensaio mecânico da cabeça femoral.

<b>Grupo</b>	<b>Média do módulo de elasticidade (E) (N/mm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>	<b>Média da resiliência (N/mm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>
<b>Fêmea I</b>	197,65 ± 84,59	2,53 ± 0,83
<b>Machos I</b>	284,02 ± 175,83	2,92 ± 1,42
<b>Machos II</b>	231,14 ± 76,52	1,54 ± 0,95
<b>Fêmeas III</b>	156,42 ± 68,56	0,89 ± 1,82
<b>Machos IV</b>	294,71 ± 49,71	0,75 ± 0,94
<b>Fêmeas V</b>	116,48 ± 21,58	1,18 ± 0,68
<b>Machos V</b>	194,71 ± 65,82	1,80 ± 1,32

Em ambos os géneros pode perceber-se que o *stress* teve influência na perda de rigidez (módulo de elasticidade) da cabeça do fémur, bem como na perda de resiliência. No entanto, para o indivíduo que sofreu tratamento IV, o seu módulo de elasticidade aumentou 3% em comparação com o grupo controlo. Este também foi o indivíduo que apresentou menor energia absorvida na fase elástica, significando que deste modo o osso na zona da cabeça femoral pode facilmente sofrer uma ruptura óssea influenciado pela sua elevada rigidez, mas fraca resiliência. Os animais que sofreram o tratamento III demonstraram um módulo de elasticidade menor que o seu controle, e a energia

absorvida na fase elástica foi inferior ao seu controlo 64%, assim este grupo de animais pode estar susceptível a problemas ósseos uma vez que o nível de tensões suportado será inferior.

Os animais que sofreram o tratamento IV têm baixo módulo de elasticidade logo os valores de energia absorvida na fase elástica são maiores que os grupos II, III, e IV. Nota-se, no entanto, que em todos os casos existem sempre valores mais baixos para o género feminino.

No Gráfico 17, encontram-se representados os valores médios do módulo de elasticidade e os respectivos desvios padrão para cada animal tratado. É possível observar no Gráfico 18 os valores correspondentes à resiliência, na cabeça do fémur.

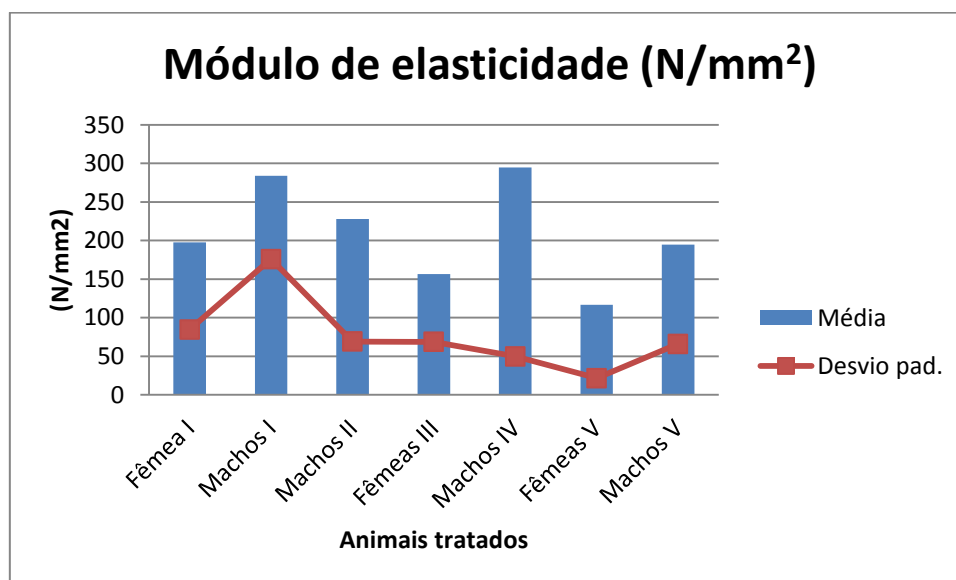


Gráfico 17: Média do módulo de elasticidade e desvio padrão (N/mm<sup>2</sup>).

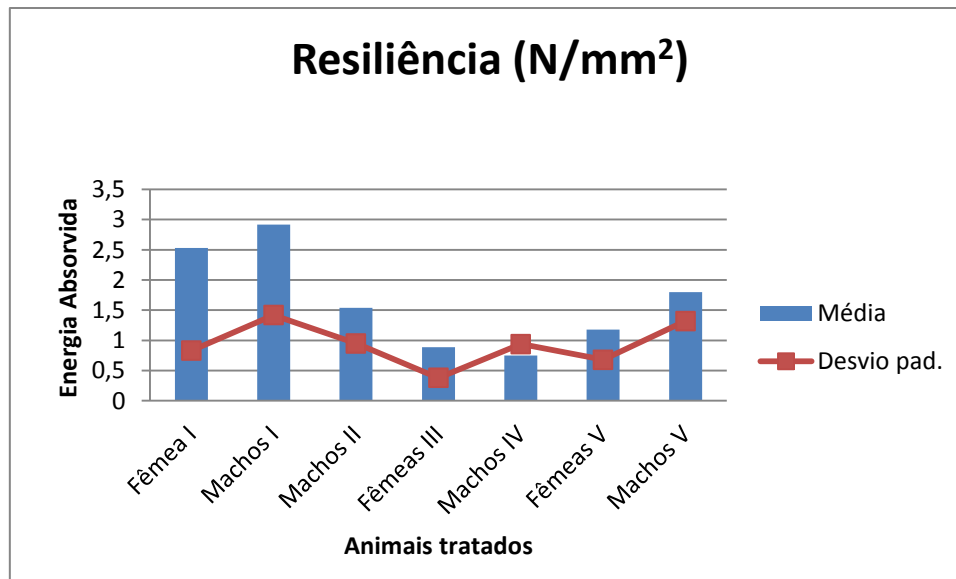


Gráfico 18: Energia absorvida, obtida através da compressão da cabeça do fêmur.

Os valores para o ensaio mecânico sobre a diáfise do fêmur estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Ensaio mecânico da compressão da diáfise do fêmur

<b>Grupo:</b>	<b>Média do módulo de elasticidade (N/mm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>	<b>Média da resiliência (N/mm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>
<b>Fêmea I</b>	1800,61 ± 587,25	2,18±0,64
<b>Machos I</b>	2258,37 ± 762,76	7,48 ± 3,87
<b>Machos II</b>	1855,63 ± 829,57	5,81 ± 3,63
<b>Fêmeas III</b>	1576,65 ± 66,96	1,79 ± 1,43
<b>Machos IV</b>	2487,89 ± 1179,96	1,60 ± 1,96
<b>Fêmeas V</b>	1323,07 ± 1039,91	1,52 ± 1,03
<b>Machos V</b>	1556,76 ± 411,132	2,29 ± 1,14

Os valores do módulo de elasticidade para a diáfise são superiores nos machos em todos os casos em comparação com o mesmo tratamento em relação às fêmeas. Observa-se que o animal com maior módulo de elasticidade é o que sofreu o tratamento IV, tendo aumentado 11% em comparação com os grupos de controlo. Este grupo apresenta também a menor a menor energia absorvida, indicando assim que a sua resiliência é muito reduzida em comparação com os outros grupos. Os baixos valores de resiliência,

apesar de registados com uma elevada rigidez, indicam que no osso pode ocorrer fractura após o limite de cedência.

No caso dos indivíduos que sofreram o tratamento V verifica-se uma clara perda de rigidez óssea sendo de 26.5% para as fêmeas e de 31% para os machos, comparando com os respectivos grupo de controlo sendo assim apenas nos casos dos indivíduos que fizeram o tratamento V o módulo de elasticidade é mais baixo, ou seja os glucocorticóides têm influência no módulo de elasticidade da diáfise comprometendo a estabilidade óssea. O género feminino do tratamento V é assim aquele grupo que apresenta uma menor energia absorvida, significando um elevado risco de fractura.

Analisando os valores do grupo III, nota-se que para o caso da diáfise são aproximadamente 17% inferiores que os valores do controlo.

É de notar que na diáfise femoral os valores de energia absorvida, bem como o módulo de elasticidade para o género masculino tem um decréscimo muito mais significativo que para o caso do género feminino. Para ambos os casos o género masculino, sofre perdas mais intensas que o género feminino.

No Gráfico 19 é possível ter uma perspectiva esquemática da média do módulo de elasticidades referentes à zona da diáfise do fémur, bem como o desvio padrão.

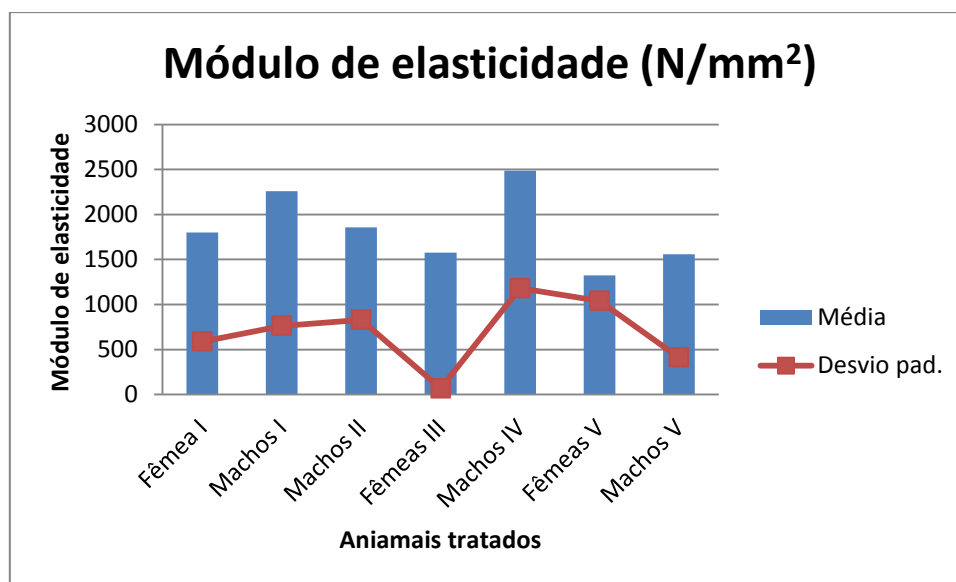


Gráfico 19: Média do módulo de elasticidade da diáfise do fémur.

No Gráfico 20 observa-se a energia absorvida até à cedência óssea para a compressão da diáfise do fémur.

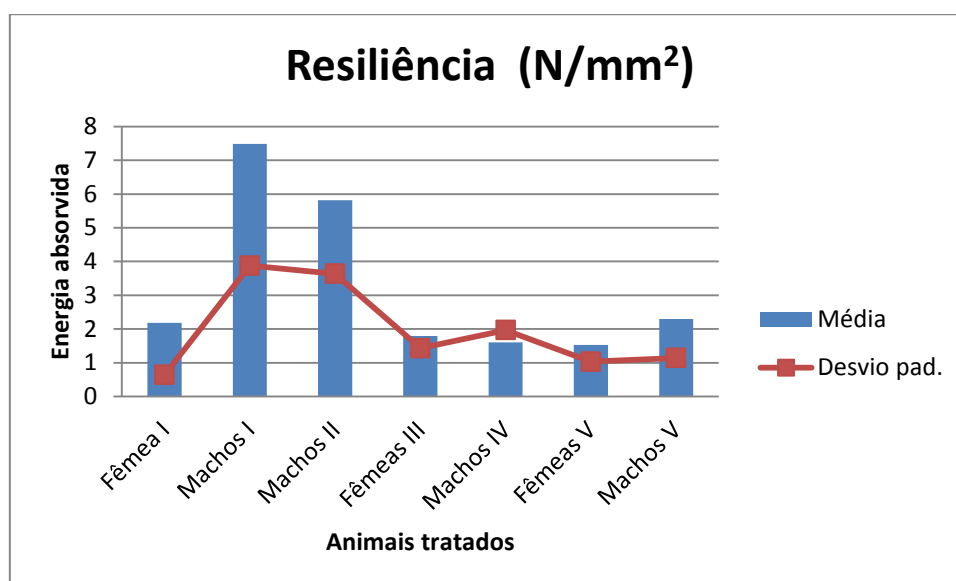


Gráfico 20: Energia absorvida até à cedência na compressão da diáfise femoral

Sabendo que a GH é responsável pelo crescimento longitudinal ósseo, poderá estar assim desta forma a afectar a capacidade de absorção energética, por parte do osso.

Na Tabela 7 com a análise dos resultados para a espessura do osso cortical e o diâmetro do canal medular, pode ver-se que os valores são bastante semelhantes e não apresentam elevada disparidade entre si. Os indivíduos não sofreram um protocolo de *stress* suficientemente agressivo para que houvesse uma diminuição do osso cortical.

Tabela 7: Análise da espessura do osso cortical da diáfise

Grupo:	Média da espessura do osso cortical (mm) e desvio padrão	Média do diâmetro do canal medular (mm) e desvio padrão
<b>Fêmeas I</b>	0,645 ± 0,020	5,01 ± 0,07
<b>Machos I</b>	0,701 ± 0,045	5,21 ± 0,19
<b>Machos II</b>	0,689 ± 0,023	5,15 ± 0,51
<b>Fêmeas III</b>	0,661 ± 0,007	4,98 ± 0,13
<b>Machos IV</b>	0,698 ± 0,034	5,15 ± 0,25
<b>Fêmeas V</b>	0,625 ± 0,036	4,87 ± 0,16
<b>Machos V</b>	0,694 ± 0,025	4,99 ± 0,36

O Gráfico 21 representa os valores médios da espessura do osso cortical através de corte horizontal da diáfise femoral, bem como os respectivos desvios padrão. No Gráfico 22 encontram-se as medidas para o diâmetro do canal medular da diáfise do fêmur.

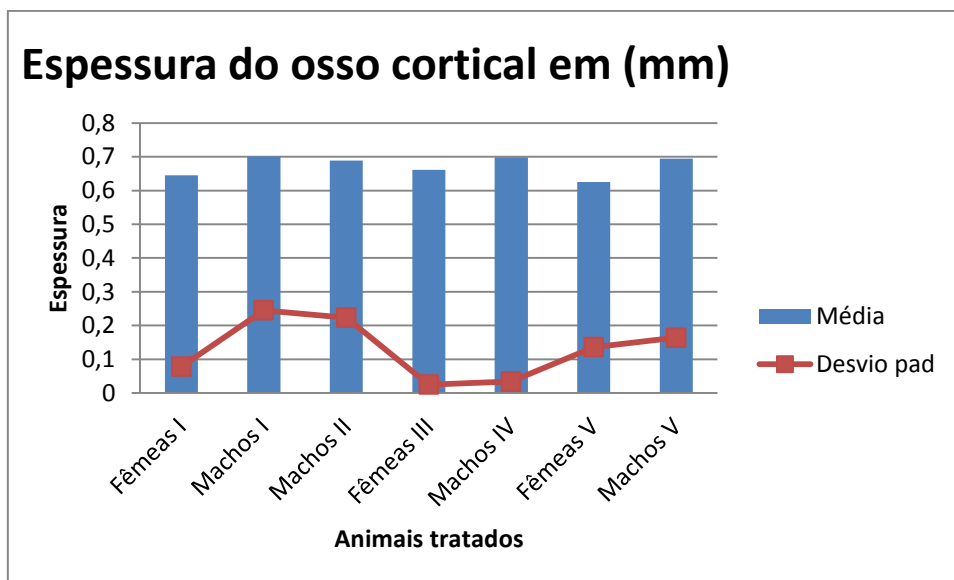


Gráfico 21: Espessura do osso cortical.

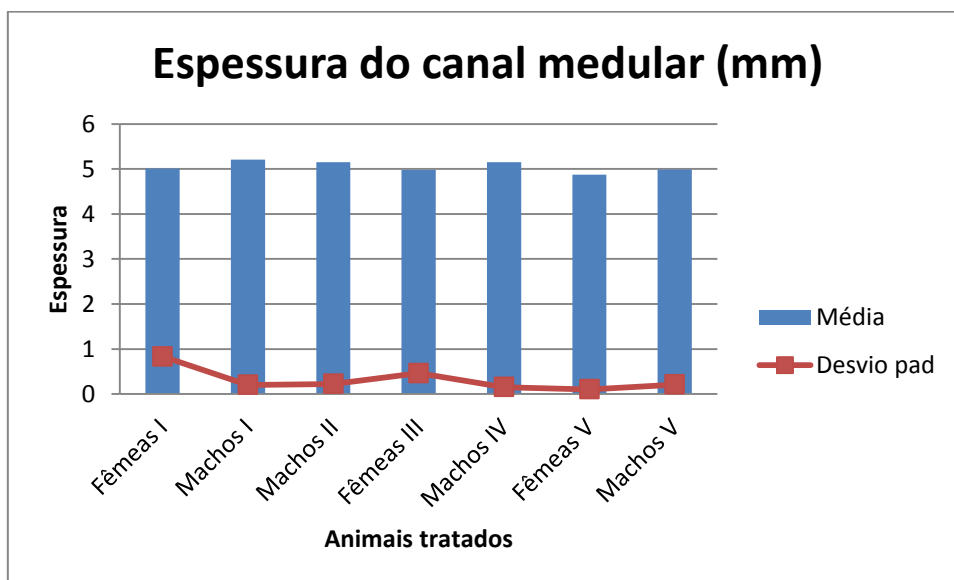


Gráfico 22: Diâmetro do canal medular.

#### 4.4. Histomorfometria

Na Tabela 8 e no Gráfico 23 observam-se os resultados das medições histomorfométricas, BV/TV, obtidos com o auxílio do *software* ImageJ®. Devido a

perdas de material durante o processamento, os resultados obtidos não têm uma margem de confiança elevada. Pode observar-se que não existe qualquer tipo de concordância com os valores obtidos através de exame de densitometria.

Tabela 8: Resultados obtidos através de histomorfometria.

Grupo	Osso trabecular na cabeça do fêmur (%)
	Média e desvio padrão
Fêmeas I	36,34±9,05
Machos I	51,12±7,4
Machos II	43,17± 6,8
Fêmeas III	40,23±0,32
Machos IV	44,99±1,21
Fêmeas V	47,64±1,66
Machos V	50,42±8,52

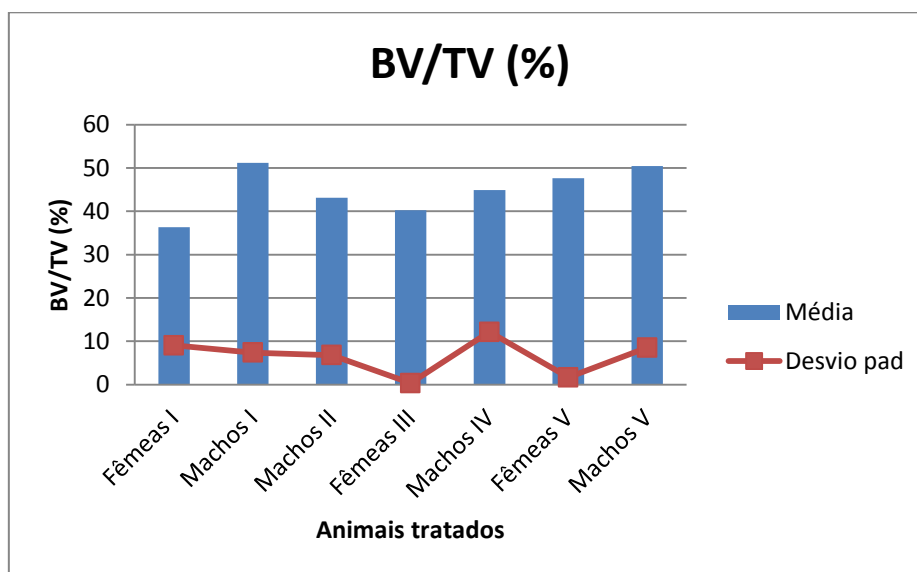


Gráfico 23: Variação do volume trabecular ósseo

#### 4.5. Imunoistoquímica

Todas as lâminas analisadas mostraram marcação imunoistoquímica, mas as diferenças foram quase imperceptíveis. A falta de diferenças pode dever-se à degradação de algum material com o manuseamento e processamento do mesmo, provocando assim uma falta

de resultados aparente.

## Capítulo 5

### Análise comparativa de influência do *stress* moderado crónico com animais de diferentes idades

Neste capítulo será efectuada uma análise dos dados estudados por VALENTE, em que o factor limitante era apenas o *stress*. Os animais foram divididos por idades, jovens e idoso, e também por género. É possível observar-se na Tabela 9 o protocolo de *stress* adoptado.

Tabela 9: Protocolo de *stress*

<b>Dias</b>	<b>Agente stressante</b>	<b>Hora Início</b>	<b>Duração</b>
1, 8, 15, 22	Frio	14:00	2 horas
2, 9, 16, 23	Calor	16:00	2 horas
3, 10, 17, 24	Isolamento	07:00	24 horas
4, 11, 18, 25	Inclinação da gaiola	13:00	3 horas
5, 12, 19, 26	Privação de água	7:00	12 horas
	Privação de comida	19:00	12 horas
6, 13, 20, 27	Condições padrão		
7, 14, 21, 28	Imobilização	7:00	20 min
	Iluminação noturna	19:00	

#### 5.1. Ratos jovens

Como é possível observar na Tabela 10 os valores de DMO dos indivíduos de controlo

para ratos jovens são mais elevados para o sexo masculino que para o feminino, sendo que existe uma diminuição de DMO, para ambos os sexos em casos em que estes são submetidos a *stress*. Verifica-se que o *stress* tem influência na perda de massa óssea, porém o *stress* para o caso de indivíduos jovens é mais preponderante no caso das fêmeas visto que perderam cerca de 11.7% da sua DMO inicial em comparação com os machos, que perderam apenas 6.6% da DMO inicial. Comprova-se assim que o *stress* pode afectar diferentes indivíduos, mas afecta cada um deles de maneira diferente.

Tabela 10: Resultados Densitométricos para ratos jovens [43].

<b>Grupo</b>	<b>Média CMO (g) e desvio padrão</b>	<b>Média da área (cm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>	<b>Média de DMO (g/cm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>
<b>Macho controlo</b>	0,456 ± 0,049	1,825 ± 0,104	0,250 ± 0,015
<b>Fêmea controlo</b>	0,383 ± 0,071	1,544 ± 0,170	0,248 ± 0,029
<b>Macho <i>stress</i></b>	0,471 ± 0,041	1,996 ± 0,083	0,236 ± 0,028
<b>Fêmea <i>stress</i></b>	0,334 ± 0,020	1,527 ± 0,082	0,219 ± 0,010

## 5.2. Ratos Idosos

Na Tabela 11 podem ser observados os resultados do exame DEXA, para ratos idosos. Segundo os valores de DMO de fêmea controlo e macho controlo, apesar de estes indivíduos serem já idosos, não existe uma diferença entre a sua DMO tão grande como seria de esperar. Todavia quando é imposto o *stress* as fêmeas tem uma perda percentual de DMO muito superior aos machos, sendo para elas 24,31%, e para eles 8,09%, o que pode significar que nesta idade as fêmeas estão mais susceptíveis ao *stress* que os machos.

Tabela 11: Resultados densitométricos para ratos idosos [43].

<b>Grupo</b>	<b>Média CMO (g) e desvio padrão</b>	<b>Média da área (cm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>	<b>Média de DMO (g/cm<sup>2</sup>) e desvio padrão</b>
<b>Macho controlo</b>	0,561 ± 0,011	2,065 ± 0,022	0,272 ± 0,006
<b>Fêmea controlo</b>	0,382 ± 0,060	1,565 ± 0,034	0,251 ± 0,030
<b>Macho stress</b>	0,569 ± 0,052	2,277 ± 0,106	0,250 ± 0,016
<b>Fêmea stress</b>	0,349 ± 0,091	1,824 ± 0,286	0,190 ± 0,038

Com a comparação de resultados pretende-se provar que o *stress* influencia a perda de massa óssea, para ambos os sexos, bem como para as diferentes idades, jovens, adulto e idosos. A perda de massa óssea é também mais evidente para o género feminino em comparação com o género masculino.

Um dos factores que pode contribuir para que a perda de DMO seja mais intensa nas fêmeas que nos machos, é a diminuição hormonal no género feminino, nomeadamente os níveis de estrogénio.



## Capítulo 6

### Conclusões e Trabalhos Futuros

Com o aumento da esperança média de vida há um profundo interesse em que os indivíduos possam apreciar a sua vida com qualidade e saúde, pelo que é importante perceber como surgem certas doenças para que se possam combater. Um dos maiores problemas de saúde pública nos países mais desenvolvidos é a osteoporose. A osteoporose é actualmente considerada um dos problemas de saúde, sendo que na população idosa, especialmente a do género feminino, existe a maior incidência.

A osteoporose caracteriza-se pela baixa densidade óssea e pela degeneração da microarquitECTURA óssea, convergindo assim num problema de fragilidade óssea, e de fácil exposição a fracturas. Numa fase inicial a osteoporose é associada à falta de sintomas, e só num estado avançado de desenvolvimento é que manifesta dor crónica. Quando há a ocorrência de fracturas osteopóricas, a do colo do fémur é a mais frequente, sendo também a que tem um tratamento mais invasivo e urgente, devido à enorme facilidade de necrose. Muitos factos apontam que o estilo de vida actual não é o mais indicado. O que se come e bebe, muitas vezes a falta de exercício físico, e até as noites mal dormidas podem trazer complicações associadas a esta patologia.

Com este trabalho podem ser retiradas conclusões relativas a este assunto, sendo que o factor *stress* é bastante abrangente. Pode assim perceber-se que este tem uma grande influência na perda de massa óssea, em todas as idades e em ambos os géneros. A perda de massa óssea está também fortemente associada a hormonas femininas, visto que é este género que perde maior DMO.

Após a conclusão deste trabalho observou-se que o protocolo de *stress* moderado

crónico, consegue provocar perda de massa óssea, e comprometer assim a sua estrutura, este facto é comprovável através da análise dos resultados mecânicos e de densitometria, sendo perceptível a perda de densidade óssea, para ambos os géneros.

A introdução de GH no protocolo de *stress* deixa algumas dúvidas, uma vez que para o exame densitométrico se nota um aumento da DMO, nos ensaios mecânicos verifica-se que o grupo de animais que sofreu tratamento com GH, apresenta uma energia absorvida muito baixa.

A introdução de GC's vem de encontro à grande tomada de medicamentos, que têm este tipo de hormonas. Justifica-se assim de interesse saber qual o seu papel na microarquitetura óssea. Os resultados da aplicação de GC's demonstram que estes são desfavoráveis para a massa óssea, sendo que em todos os exames se demonstrou que esta hormona é prejudicial à estrutura óssea. Com a avaliação dos resultados demonstra-se mais eficiente no que respeita a diferenças entre o osso trabecular e o osso cortical, afirmando-se que este protocolo não é suficientemente agressivo para os ossos cortical da diáfise do fémur, por não efectuar mudanças significativas na estrutura.

Quanto aos valores de RANK/RANKL/OPG não foi possível obter nenhuma resposta em concreto, podem dever-se a falhas durante o processo de imunoistoquímica.

Existem muitos estudos com modelos de *stress* crónico sobre glândulas produtoras de hormonas e o sistema nervoso, no entanto com este trabalho pode perceber-se qual o papel do stress na perda de massa óssea em concreto atendendo a diferentes variáveis e factores. Com o tipo de experiências realizadas neste trabalho foi possível obter informações distintas, sendo possível detectar a causa-efeito nas diferentes variáveis. O estudo possibilita extrapolar o conhecimento obtido em *Rattus norvegicus* para estruturas ósseas de humanos. Com este trabalho identificaram-se diferentes metodologias simples e válidas que permitem obter informação importante sobre a perda da massa óssea em estruturas biológicas celulares.

Como trabalhos futuros seria interessante estudar o *stress* na gravidez e a influência na massa óssea da progenitora bem como dos fetos. Verificar a influência no número de fetos bem como a possibilidade de aborto espontâneo. Também o estudo da influência da gravidez na perda de massa óssea, comparativamente com indivíduos que nunca engravidaram seria um tema de interesse.

Para cada um destes temas a utilização de um maior número de indivíduos seria interessante para garantir uma melhor amostragem.

## **Bibliografia**

[1] GROSSKAUSS, Dany B. B. S. (2011). Estudo de densitometria óssea de cães SRD com as propriedades físicas e químicas. UnESP, Botucatu-SP Brasil.

[2] MATSUDO, Sandra Mahecha; Matsudo, Victor K. R. (1992). Prescrição e benefícios da atividade física na terceira idade. Revista Brasileira de Ciencia & Movimento. 6(4), p.19-30.

[3] DENFORFER, S., Maier, H.J., Taylor, D., et al. (2008). Anisotropy of the fatigue behaviour of cancellous bone. Journal of Biomechanics, 41, p.636-641.

[4] [https://osha.europa.eu/pt/topics/stress/definitions\\_and\\_causes](https://osha.europa.eu/pt/topics/stress/definitions_and_causes)

[5] SELEY, Hans. (1973). The Evolution of the Stress Concept. American Scientist Vol. 61, No. 6 (November-December 1973), p. 692-699

[6] LUCIO, Miguel. Efeito da osteoporose e da osteoartrose nas propriedades mecânicas e estruturais do osso trabéculas, (2008), Instituto Superior Técnico, Lisboa.

[7] CHAU, Fernando, ET Al. (2012). Envelhecimento da população: dependência, activação e qualidade. Centro de estudos dos povos de cultura e expressão Portuguesa. Universidade Católica Portuguesa, Lisboa.

[8] KINSELLA, Kevin G., Velkoff, Victoria A. (2001). An Aging World, 2001. Bureau of the Census. United States.

[9] JUNQUEIRA, C. Luiz, Carneiro, José. (2008), Histopatologia Basica Texto/Atlas, 11ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

[10] REEVE, J, Meunier PJ, Parsons JA, et al. (1980) Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a

multicentre trial. Br Med J 1980;280:1340-4.

[11] European Medicines Agency, (2008). Relatório Publico Europeu de avaliação (EPAR),PARAREG.

[12] HAEL, Susan J, Biomecânica básica,(1993), 1ª edição, Guanabara koogan, Rio de Janeiro, Brasil

[13] <http://www.pediatriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/874.pdf>

[14] PARDON, M. Stress and ageing interactions: Aparadox in the contexto of shared etiological and phisiopatological processes. Brain research Reviews. v.54.p.251-273.2007.

[15] LI, H, Qian W, Weng X, Wu Z, Li H, et al. (2012) Glucocorticoid Receptor and Sequential P53 Activation by Dexamethasone Mediates Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Osteoblastic MC3T3-E1.

[16] JUREMA, Mario F., Et Al, O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão,(2004), Revista Brasileira de Psiquiatria 2004; v.26(3).p.189-201.

[17] HERMAN, James P., Et Al, Limbic system mechanisms of stress regulation:Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, (2005), Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 29 p. 1201 – 1213.

[18] BRUNNER, LC, Eshilian-oates L. Hip Fractures in Adults. AMERICAN FAMILY PHYSICIAN, FEBRUARY 1, 2003 / VOLUME 67, NUMBER 3,537-542.

[19] CANHÃO, H, FONSECA JE, QUEIROZ, MV. Epidemiologia da osteoporose. Mecanismos de Remodelação óssea e factores protectores do osso. Acta Reum Port 2005; 30: 225-40.

[20] RALSTON, SH, Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and

susceptibility to osteoporosis. (2006), Spring Harbour Laboratory Press;

[21] GRCEVIC, D.; KATAVIC, V.; LUKIC, I. K.; KOVACIC, N.; LORENZO, J. A.; MARUSIC, A. Cellular and Molecular Interactions between Immune System and Bone. Croatian Medical Journal, v. 42, n. 4, p. 384-392. 2001.

[22] FENG, X. Regulatory Roles and Molecular Signaling of TNF Family Members in Osteoclasts. Gene, v.350, p.1-13. 2005.

[23] YANFEI L. MA, Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1–38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation,(2001), Endocrinology 142(9):4047–4054.

[24]PROENÇA, Adrião, Ortopedia Traumatologia, Imprensa da Universidade de Coimbra, 2ª Edição, 2008, Portugal.

[25]TUREK, Samuel L., Ortopedia, volume 1, Editora Manole, 4ª Edição, 1991, Brasil.

[26] AN, Draughn RA. Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface. CRC Press LLC,Boca Raton, 2000.

[27] WECKER, Jonas E., Aula de Anatomia, <http://www.auladeanatomia.com>, Setembro 2013.

[28] BORON, WF, Boulpaep, EL, Medical Physiology. Saunders, 2003.

[29] FIGUEIRO, Daniela, Sousa, Liliana. Portugal, Capítulo 8,Family care of older people in Europe, Biomedical and health research, European Commission, IOS Press, 2001.

[30] LEÃO, Jairo, <http://medicinafontes.blogspot.pt/2013/05/osteoporose.html>, Setembro 2013.

[31] CANHÃO,H. C. M., Contribuição para a prevenção da osteoporose, Tese de

Doutoramento em Medicina (Reumatologia) Faculdade de Medicina de Lisboa, 2007.

[32] GRASSO, Andreia N., Estudos espectroscópicos dos complexos Erópio-tetraciclina e suas aplicações na detecção de hidrogénio e peróxido de ureia, Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares , São Paulo, 2010.

[33] MAIA, Juliana, Osteoporese: classificação e diagnóstico, Universidade de Endocrinologia e Diabetes. <http://www.slideshare.net/AdrianoPires/osteoporose-clasediag>, Junho 2013.

[34] Universidade de Cantaria, Aula virtual, Capítulo 13. Envejecimiento músculo-esquelético, 2011.

[35] SANTOS, L. M. F., Análise comparativa dos parâmetros quantitativos do osso osteoporótico modelado computacional de remodelação Óssea vs resultados clínicos de dexa, Instituto Superior Técnico de Lisboa, 2007.

[36] INE- Instituto Nacional de Estatística. População residente 2011.

[37] PAULI, J.R., ET AL. Glicocorticóide, Síndrome metabólica e exercício físico, Universidade estadual de Campinas, Brasil, Rev Port Cien Desp 6(2) 217–228.

[38] DAUDT, Luciana D., Efeito da inalação de glicocorticóides sobre a perda óssea alveolar em ratos Wistar. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009.

[39] SHIMON, I. , “Growth hormone replacement for adult growth hormone deficiency,” Expert Opinion on Pharmacotherapy, vol. 4, no. 11, pp. 1977–1983, 2003.

[40] ERNST, M. and FROECH, E. R., “Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I,” Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 151, no. 1, pp. 142–147, 1988.

[41] JOUNG, Y. H, Lim E. J., Darwin, P. et al., “MSM enhances GH signaling via the

Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs,” PLoS One, vol. 7, no. 10, Article ID e47477, 2012.

[42] XUE, Peng, et al. Effects of Growth Hormone Replacement Therapy on Bone Mineral Density in Growth Hormone Deficient Adults: A Meta-Analysis, International Journal of Endocrinology, Volume 2013 (2013), Article ID 216107, 13 pages

[43] VALENTE, Fabricio, “Efeito do estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos jovens e idosos”, Universidade Federal de Viçosa, 2011, Brasil

[44] FONSECA, EMM; Apontamentos de MSM; Engenharia Biomédica; IPB; 2009.

[45] GOMES, J.S.; Mecânica dos sólidos e Resistência dos materiais; S.L: INEG/FEUP; 2004.

[46] <http://brd.docdat.com/docs/158/index-81784.html>



## **Anexos**

### **Protocolo de imunohistoquímica utilizado no trabalho experimental**

#### Desparafinização:

1. Colocar as lâminas a analisar na estufa durante duas horas à temperatura de 65°C
2. Colocar em xilol I durante cinco minutos
3. Colocar em xilol II durante cinco minutos

#### Reidratação:

4. Colocar as lâminas em Álcool 100% durante cinco minutos
5. Repetir o processo em novo álcool a 100% durante cinco minutos
6. Colocar as lâminas numa solução composta por metanol e 3% de peróxido durante 30 minutos
7. Colocar as lâminas em álcool a 96% durante cinco minutos
8. Repetir a introdução das lâminas em álcool a 96% durante cinco minutos.
9. Colocar as lâminas em álcool a 70% durante cinco minutos.
10. Colocar as lâminas em PBS durante cinco minutos.
11. Repetir o processo colocando as lâminas em PBS durante cinco minutos.

#### Recuperação antigénica:

12. Colocar as lâminas em tripsina à temperatura de 37°C
13. Estabilização das lâminas em temperatura ambiente durante vinte minutos.
14. Colocar as lâminas em PBS durante cinco minutos.
15. Repetir o processo colocando as lâminas em PBS durante cinco minutos.

#### Bloqueio da Biotina endógena:

16. Colocar as lâminas na solução de Adivina durante vinte minutos.
17. Colocar as lâminas na solução de PBS durante cinco minutos.
18. Colocar novamente as lâminas na solução de PBS durante cinco minutos
19. Colocar as lâminas na solução de leite em pó durante trinta minutos.
20. Colocar as lâminas na solução de PBS durante cinco minutos.

21. Recolocar as lâminas na solução de PBS durante cinco minutos.

#### Incubação com anticorpo primário

22. Secar as lâminas ao redor com papel absorvente.
23. Colocar as lâminas em câmara húmida com uma diluição de anticorpo primário diluído na proporção de 1:50 com solução de PBS, à temperatura de 4° durante 12 horas.
24. Colocar as lâminas em solução de PBS durante cinco minutos.
25. Recolocar as lâminas em solução de PBS durante 5 minutos.

#### Incubação com anticorpo secundário:

26. Secar as lâminas ao redor com papel absorvente
27. Adicionar uma solução com anticorpo secundário diluído numa proporção de 1:100 com solução de PBS, em câmara húmida à temperatura de 37°C durante uma hora.
28. Colocar as lâminas em solução de PBS durante cinco minutos.
29. Repetir o processo colocando as lâminas em solução de PBS durante cinco minutos.

#### Incubação de substrato de Estreptovidina:

30. Secar as lâminas ao redor com papel absorvente.
31. Colocar solução de substrato diluído na proporção de 1:500 nas lâminas, em câmara húmida durante uma hora.
32. Colocar as lâminas em solução de PBS durante cinco minutos.
33. Repetir o processo colocando as lâminas em solução de PBS durante cinco minutos.

#### Solução reveladora:

34. Secar as lâminas com papel absorvente ao redor.
35. Colocar as lâminas em câmara húmida e adicionar 200µl de solução DAB durante sete minutos.
36. Retirar a solução DAB cautelosamente com água destilada.

Coloração de desidratação:

37. Colocar as lâminas em solução de Hematoxilina de Harris, durante 10 segundos.
38. Colocar as lâminas em álcool a 70% durante cinco minutos.
39. Colocar as lâminas em álcool a 80% durante cinco minutos.
40. Colocar as lâminas em álcool a 90% durante cinco minutos.
41. Colocar as lâminas em álcool a 100% durante cinco minutos.
42. Repetir a colocação das lâminas em álcool a 100% durante cinco minutos.
43. Colocar as lâminas em xilol I durante cinco minutos.
44. Colocar as lâminas em Xilol II durante cinco minutos.



**Cópia do certificado emitido pela Comissão de Ética para o uso de Animais da UFV**

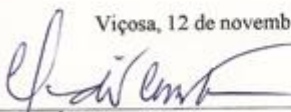
**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética do DVT / UFV certifica que o processo n.º 52 / 2009, intitulado **“Perda óssea e sua relação com a expressão de citocinas inflamatórias em ratos idosos submetidos a estresse moderado crônico”** coordenado pela Professora Marlene Isabel Vargas Vitoria do Departamento de Veterinária está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 12/11/2010.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee of DVT / UFV certify that the process number 52/2009, named **“Bone loss and inflammatory cytokines in aged rats submitted to chronic mild stress”** is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on November 12, 2010 approved this process.

Viçosa, 12 de novembro de 2010



Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV  
(CEUA / UFV)