

FABRÍCIO LUCIANI VALENTE

**ESTRESSE, ENVELHECIMENTO E OSTEOPOROSE:
ESTUDO EXPERIMENTAL DA PERDA ÓSSEA, DA EXPRESSÃO
DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E DOS MARCADORES
ÓSSEOS RANKL, RANK E OPG, EM RATOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

FABRÍCIO LUCIANI VALENTE

**ESTRESSE, ENVELHECIMENTO E OSTEOPOROSE: ESTUDO
EXPERIMENTAL DA PERDA ÓSSEA, DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS E DOS MARCADORES ÓSSEOS RANKL, RANK E
OPG, EM RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 10 de junho de 2011.

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo
Co-orientador

Prof^a. Sandra Aparecida L. de Moura

Prof. Luiz Alberto Santana

Prof. Rodrigo Siqueira Batista

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Orientadora)

*Este trabalho é dedicado a todos que direta
ou indiretamente contribuíram para sua
realização e a todos que possam ser
favorecidos pessoal ou profissionalmente
pelo conhecimento aqui divulgado.*

"A maioria de nós convive diariamente com coisas que não entende, no mínimo tanto quanto acontecia com os gregos ou os babilônios. No entanto, aprendemos a não fazer perguntas a respeito do funcionamento da direção hidráulica do nosso carro, sobre como se faz a vacina contra a pólio ou em que consiste o processo de congelamento do suco de laranja. Terminamos na situação paradoxal em que um dos efeitos da ciência consiste em embotar a curiosidade".

O amigo físico de K. C. Cole,
em *Primeiro você constrói uma nuvem.*

AGRADECIMENTOS

Acredito que a finalização de um período como o curso de um doutorado deixa claro o quanto é forte o vínculo entre cada uma das etapas que trouxeram a vida a este momento. Por isso, são muitas as pessoas, em diversos tempos, pelas quais sinto a mais generosa gratidão ao finalizar este trabalho. Assim, é praticamente impossível listar a importância que cada um tem ou teve neste longo caminho, que é árduo e laborioso, como todos os caminhos, mas o melhor e mais prazeroso caminho, graças à existência destas pessoas. Eu agradeço.

A toda minha família pela fonte inesgotável de esperança. Meus pais, Luiz Antônio e Maria Aparecida; meus irmãos, Aline, Luiz Gustavo e Geisiane; meus sobrinhos, Yasmim e Luiz Pedro; meus avós, Antônio e Eni, e Almerinda; tios e primos, obrigado a todos por todo apoio, confiança e amor! E também ao Eckl, meu pequeno grande companheiro.

Aos grandes amigos Angélica, Elaine e Luís Roberto, pela companhia segura, pela amizade, pela compreensão, pelos pés no chão, pela cabeça nas nuvens, por serem e estarem. Ao Rafael e a Érika; aos amigos da república, Thiago, Felipe, Higor, Flávio, Ivan, Daniel, Lauro; Aloísio e Alice. Aos amigos que me acompanharam daqui de perto e que merecem todo o sucesso que vêm conquistando, Ana Paula Peconick e Emily, obrigado pelo grande apoio pessoal e profissional! Ao Gabriel, ao João Paulo e ao Breno, pelo apoio, por segurarem as pontas sempre que precisei. Aos amigos e colegas do LBCHV, especialmente ao Gabriel Tafur, presentes em muitas etapas deste processo.

Ao Leonardo pela grande ajuda não apenas como bolsista, mas pelo otimismo, dedicação e disponibilidade, pela confiança que teve em mim e que tenho por ele.

A todos os professores do Departamento de Veterinária, que vêm ajudando a construir minha formação há tantos anos, por toda a vivência, experiência e oportunidades. Aos Professores Ricardo Junqueira, Luís Augusto Nero, Cláudio Fonseca, Andréa Pacheco, João Carlos, Eduardo Paulino, José Domingos. Aos Professores de outros departamentos, que colaboraram valiosamente com este trabalho, a Professora Ita e aos Professores Luiz Alberto, Rodrigo e Natali. A Professora Sandra da Universidade Federal de Ouro Preto, pela preciosa contribuição para a versão final

deste trabalho. A Professora Adelina da Universidade Federal de Minas Gerais pelos conselhos iniciais e análises hormonais.

Agradeço especialmente ao Professor Mário Jefferson da UNESP/Araçatuba e à sua equipe, que me receberam com disposição, bom-humor, otimismo e muita boa vontade. Obrigado pela inestimável contribuição, não apenas em termos técnicos, que foram, sem dúvida, cruciais, mas também por aquela que ensina afinal o objetivo de tudo isso. Obrigado, Professor, foi uma honra conhecê-lo!

A todos os funcionários da UFV, que tornaram mais fácil a realização deste trabalho. Ao Sr. Adão do Biotério; Claudio e Adão da Histopatologia; Márcio Mendes do LBCHV; ao Geralidinho do DVT e ao Sr. Olindo. Agradeço a Rosi - não consigo expressar o quanto sou grato por tudo! Ao Rogerinho pelo sempre presente apoio.

Aos grandes professores com quem já tive oportunidade de aprender. Aos Professores Duarte, Sumaia, Beatriz, Marta.

Aos alunos que sempre me ensinam a ensinar.

A todos que encontrei por acaso, e que colaboraram sem que percebessem para que tudo desse certo, como o Sr. Dimas, a Elisa e o Vaguinho.

A Valéria, a Mariana e a Cecília, por eu poder contar com vocês como minha família.

Ao meu grande amigo Luiz Antônio, por sinceramente tudo, todo o aprendizado que me proporcionou e tudo que ainda está por vir.

A Anna Paula Ferreira, pela amizade, pela cumplicidade, pela paciência, pela confiança. Agradeço também à sua família, por todo o carinho.

A Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades. A FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro na execução do projeto, e à primeira pela concessão de bolsa durante parte do curso.

A Professora Marlene, eu agradeço pela oportunidade de aprendizado, pela orientação, pelos cuidados, pelos ensinamentos todos. Professora, quero um dia ser como a senhora e ter pelo menos metade da sua força. Muito obrigado por tudo.

Ao Professor Patarroyo, que, mais que imunologia ou parasitologia ou qualquer coisa que haja em livros e artigos, me ensinou a aprender.

A todos vocês que me ensinam muito mais do que imaginam, muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Apresentação	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Distribuição do conteúdo	4
1.4 Referências bibliográficas	6
2 CAPÍTULO I	9
2.1 Resumo	10
2.2 Abstract	11
2.3. Introdução	12
2.4 Senilidade	13
<i>2.4.1 Definições e epidemiologia</i>	<i>13</i>
<i>2.4.2 Fisiologia do envelhecimento</i>	<i>14</i>
<i>2.4.3 Modelos experimentais para o estudo do envelhecimento</i>	<i>17</i>
2.5 Estresse	19
<i>2.5.1 Definições: estresse e estressores</i>	<i>19</i>
<i>2.5.2 Fisiologia do estresse</i>	<i>19</i>
<i>2.5.3 Modelos Experimentais para o Estudo da Resposta ao Estresse</i>	<i>22</i>
2.6 Osteoporose	24
<i>2.6.1 Ossos e Tecido Ósseo</i>	<i>24</i>
<i>2.6.2 O Sistema RANKL/RANK/OPG</i>	<i>27</i>
<i>2.6.3 Osteoporose</i>	<i>28</i>
2.7 Referências bibliográficas	34
3 CAPÍTULO II	46
3.1 Resumo	47
3.2 Abstract	48
3.3 Introdução	49

3.4 Aspectos Éticos	49
3.5 Animais	50
3.6 Estresse moderado crônico.....	51
3.7 Coleta e Análise do Material	53
3.8 Densitometria Óssea.....	53
3.9 Histomorfometria	55
3.10 Ensaio Biomecânico	59
3.11 ELISAs	60
3.12 Imunoistoquímica.....	60
3.13 Análises estatísticas	61
3.14 Referências bibliográficas	63
4 CAPÍTULO III.....	65
4.1 Resumo	66
4.2 Abstract.....	67
4.3 Introdução.....	68
4.4 Material e métodos.....	69
<i>4.4.1 Animais.....</i>	<i>69</i>
<i>4.4.2 Densitometria e teste biomecânico</i>	<i>69</i>
<i>4.4.3 Histomorfometria</i>	<i>70</i>
<i>4.4.4 Análises Estatísticas.....</i>	<i>70</i>
4.5 Resultados	71
<i>4.5.1 Peso corporal.....</i>	<i>71</i>
<i>4.5.2 Densitometria.....</i>	<i>72</i>
<i>4.5.3 Histomorfometria</i>	<i>75</i>
<i>4.5.4 Teste Biomecânico</i>	<i>80</i>
4.6 Discussão	83
4.7 Conclusão	86
4.8 Referências bibliográficas	87
5 CAPÍTULO IV	92
5.1 Resumo	93
5.2 Abstract.....	94
5.3 Introdução.....	95
5.4 Metodologia	96
<i>5.4.1 Animais.....</i>	<i>96</i>

5.4.2 <i>Estresse Crônico</i>	96
5.4.3 <i>Parâmetros de Avaliação Óssea e Análises Estatísticas</i>	97
5.5 Resultados	99
5.5.1 <i>Pesos</i>	99
5.5.2 <i>Densitometria</i>	100
5.5.3 <i>Histomorfometria</i>	103
5.5.4 <i>Teste Mecânico</i>	108
5.6 Discussão	111
5.7 Conclusões	114
5.8 Referências bibliográficas	115
6 CAPÍTULO V	119
6.1 Resumo	120
6.2 Abstract	121
6.3 Introdução	122
6.4 Metodologia	123
6.4.1 <i>Animais</i>	123
6.4.2 <i>Estresse Crônico</i>	123
6.4.3 <i>Parâmetros de Avaliação Óssea e Análises Estatísticas</i>	124
6.4.4 <i>Análises Estatísticas</i>	125
6.5 Resultados	126
6.5.1 <i>Pesos</i>	126
6.5.2 <i>Densitometria</i>	127
6.5.3 <i>Histomorfometria</i>	130
6.5.4 <i>Teste Biomecânico</i>	135
6.6 Discussão	138
6.7 Conclusões	140
6.8 Referências bibliográficas	141
7 CAPÍTULO VI	144
7.1 Resumo	145
7.2 Abstract	146
7.3 Introdução	147
7.4 Metodologia	148
7.4.1 <i>Animais</i>	148
7.4.2 <i>Estresse crônico</i>	149

7.4.3 Imunoistoquímica.....	149
7.4.4 Hormônios sexuais e citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	150
7.4.5 Análise estatística	150
7.5 Resultados	151
7.5.1 Hormônios sexuais.....	151
7.5.2 Citocinas inflamatórias.....	152
7.5.3 Imunoistoquímica.....	153
7.6 Discussão	155
7.7 Conclusões.....	158
7.8 Referências bibliográficas	159
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	162
ANEXO	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
B.Ar	<i>Bone Area</i>
B.Dm	<i>Bone Diameter</i>
B.Pm	<i>Bone Perimeter</i>
BMD	<i>Bone Mineral Density</i>
BV/TV	<i>Bone Volume / Total Volume</i>
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
COBE	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
Ct.Ar	<i>Cortical Area</i>
Ct.Wi	<i>Cortical Width</i>
DAB	Diaminobenzidina
DMO	Densidade Mineral Óssea
DVT	Departamento de Veterinária
DXA	<i>Dual-Emission X-Ray Absorptiometry</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMC	Estresse Moderado Crônico
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina - 1 beta
IL-6	Interleucina - 6
J	Joules (Unidade de medida de energia)
LBCHV	Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
Ma.Ar	<i>Marrow Area</i>
Ma.Dm	<i>Marrow Diameter</i>
Ma.Pm	<i>Marrow Perimeter</i>
N	Newtons (Unidade de medida de força)

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PPG	Pró-Reitoria de Pós-Graduação
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor - Alpha</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UNESP	Universidade Estadual Paulista
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Densitômetro modelo DPX-ALPHA	54
Figura 3.2	Recipiente plástico em que eram posicionadas as amostras a serem analisadas na densitometria	54
Figura 3.3	Imagem capturada pelo densitômetro do fêmur e da tíbia do mesmo animal.....	54
Figura 3.4	Tela do programa associado ao densitômetro durante a análise dos corpos vertebrais	54
Figura 3.5	Seções macroscópicas realizadas nos fêmures após a descalcificação para o processamento histológico	55
Figura 3.6	Seção macroscópica realizada nas vértebras após a descalcificação para o processamento histológico	55
Figura 3.7	Foto macroscópica do corte histológico de uma vértebra.....	56
Figura 3.8	Foto macroscópica do corte histológico de um fêmur	56
Figura 3.9	Fotomicrografia da região de osso trabecular da cabeça de um fêmur, com a sobreposição da grade composta por 192 interseções.....	57
Figura 3.10	Fotografia obtida da observação do corte histológico em lupa, no aumento de 25x	58
Figura 3.11	Esquema de análise do corte histológico representando o corte transversal da diáfise do fêmur.....	58
Figura 3.12	Desenho esquemático do teste biomecânico	59
Figura 4.1	Variação do peso corporal, em gramas, segundo sexo e idade	71

Figura 4.2	Varição do conteúdo mineral ósseo, em gramas, do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade.....	72
Figura 4.3	Varição da área, em cm^2 , do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade	73
Figura 4.4	Varição da densidade mineral óssea, em g/cm^2 , do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade.....	74
Figura 4.5	Varição da área total, da cavidade medular e do osso cortical do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm^2 , segundo sexo e idade.....	75
Figura 4.6	Varição dos diâmetros total e da cavidade medular e da espessura do osso cortical do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade	76
Figura 4.7	Varição do perímetro total e da cavidade medular do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade	77
Figura 4.8	Varição da relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular e entre a área do osso cortical e a área da cavidade medular do corte transversal da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	78
Figura 4.9	Varição do volume trabecular ósseo (BV/TV) na cabeça do fêmur e no corpo vertebral, em %, segundo sexo e idade	79
Figura 4.10	Varição da força máxima suportada, em N, no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	80
Figura 4.11	Varição da tenacidade, em J, apresentada no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	81
Figura 4.12	Varição da rigidez, em N/mm, apresentada no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	82
Figura 4.13	Representação esquemática das relações entre osso cortical e cavidade medular	84
Figura 5.1	Varição do peso corporal, em gramas, entre o peso inicial e o peso final dos animais	99

Figura 5.2 Variação do conteúdo mineral ósseo, em gramas, do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade.....	100
Figura 5.3 Variação da área, em cm^2 , do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade	101
Figura 5.4 Variação da densidade mineral óssea, em g/cm^2 , do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade.....	102
Figura 5.5 Variação da área total, da cavidade medular e do osso cortical do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm^2 , segundo sexo e idade.....	103
Figura 5.6 Variação dos diâmetros total e da cavidade medular e da espessura do osso cortical do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade	104
Figura 5.7 Variação do perímetro total e da cavidade medular do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade	105
Figura 5.8 Variação da relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular e entre a área do osso cortical e a área da cavidade medular do corte transversal da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	106
Figura 5.9 Variação do volume trabecular ósseo (BV/TV) na cabeça do fêmur e no corpo vertebral, em %, segundo sexo e idade	107
Figura 5.10 Variação da força máxima suportada, em N, no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	108
Figura 5.11 Variação da rigidez, em N/mm, apresentada no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	109
Figura 5.12 Variação da tenacidade, em J, apresentada no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	110
Figura 6.1 Variação do peso corporal, em gramas, entre o peso inicial e o peso final dos animais	126

Figura 6.2 Variação do conteúdo mineral ósseo, em gramas, do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade	127
Figura 6.3 Variação da área, em cm^2 , do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade	128
Figura 6.4 Variação da densidade mineral óssea, em g/cm^2 , do fêmur, da tíbia e da vértebra, segundo sexo e idade.....	129
Figura 6.5 Variação da área total, da cavidade medular e do osso cortical do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm^2 , segundo sexo e idade.....	130
Figura 6.6 Variação do perímetro total e da cavidade medular do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade	131
Figura 6.7 Variação dos diâmetros total e da cavidade medular e da espessura do osso cortical do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade	132
Figura 6.8 Variação da relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular e entre a área do osso cortical e a área da cavidade medular do corte transversal da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	133
Figura 6.9 Variação do volume trabecular ósseo (BV/TV) na cabeça do fêmur e no corpo vertebral, em %, segundo sexo e idade	134
Figura 6.10 Variação da força máxima suportada, em N, no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	135
Figura 6.11 Variação da tenacidade, em J, apresentada no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	136
Figura 6.12 Variação da rigidez, em N/mm, apresentada no teste de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade	137
Figura 7.1 Imunoistoquímica para avaliação da expressão de RANKL.....	154
Figura 7.2 Padrão de marcação imunoistoquímica para RANK e OPG.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Divisão dos animais em grupos, segundo o sexo, a idade e o tratamento.....	50
Tabela 3.2 Cronograma de aplicação dos estressores	51
Tabela 3.3 Medidas histomorfométricas utilizadas no presente trabalho e sua correspondência segundo a padronização sugerida por Parfitt (1987).....	58
Tabela 5.1 Esquema de aplicação do estresse crônico durante 28 dias	97
Tabela 6.1 Esquema de aplicação do estresse crônico durante 28 dias	124
Tabela 7.1 Distribuição dos animais por grupo, segundo sexo, idade e tratamento	148
Tabela 7.2 Cronograma de aplicação dos estressores	149
Tabela 7.3 Valores de p, médias e desvio-padrão para testosterona e estrógeno	151
Tabela 7.4 Valores de p, médias e desvio-padrão para IL-1 β , IL-6 e TNF- α	152
Tabela 7.5 Coeficientes de correlação de Pearson e valores de p entre hormônios sexuais e citocinas	153

RESUMO

VALENTE, Fabrício Luciani; D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2011. **Estresse, envelhecimento e osteoporose: Estudo experimental da perda óssea, da expressão de citocinas pró-inflamatórias e dos marcadores ósseos RANKL, RANK e OPG, em ratos.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-orientadores: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e Laércio dos Anjos Benjamin.

Envelhecimento, estresse e osteoporose são três condições que tomaram grande importância no mundo moderno como reflexo não apenas do estilo de vida das pessoas, mas também do crescente aumento da expectativa de vida das populações. Tais condições compartilham de diversos mecanismos comuns e a modulação de uma pode afetar direta e indiretamente as outras. A osteoporose é uma doença comum entre os idosos e, embora seja multifatorial, muitos processos inerentes ao envelhecimento contribuem com sua patogenia. O estresse crônico é capaz de comprometer a massa óssea e, assim como a osteoporose, é considerado um importante fator que compromete a qualidade de vida dos idosos. O presente trabalho busca avaliar o efeito de um protocolo de estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos segundo o sexo e a idade. Para isso, animais machos e fêmeas, com cinco ou 22-24 meses de idade foram submetidos à aplicação de estressores moderados durante 28 dias. Foram incluídos frio, calor, imobilização, inclinação da gaiola, isolamento, luz noturna e privação de água e de ração, aplicados quatro vezes cada durante o período. Animais controles de ambos os sexos, jovens e senis foram mantidos em gaiolas coletivas, com água e ração à vontade, sem qualquer outro tipo de intervenção. Os ratos foram pesados no início e ao final do período, e, após eutanásia, tiveram seus ossos e sangue coletados. Fêmur, tíbia e vértebra lombar foram analisados por densitometria óssea. Testes biomecânicos de flexão avaliaram força máxima, tenacidade e rigidez da cabeça e da diáfise do fêmur. Em análise histomorfométrica, foram obtidos os volumes trabeculares da cabeça do fêmur e do corpo vertebral e medidas do osso cortical e da cavidade medular da seção transversal do fêmur. A técnica de imunistoquímica foi realizada para a análise da expressão de RANKL, RANK e OPG no fêmur e na vértebra. Do sangue foram avaliados por ELISA: estradiol e testosterona, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . O estresse foi capaz de diminuir o peso dos ratos, independente do sexo e da idade. Sobre os parâmetros de avaliação óssea, o protocolo também mostrou capacidade de reduzir

muitas das medidas avaliadas, podendo comprometer a saúde óssea. Entretanto, o estresse afetou um maior número de variáveis entre os animais jovens que entre os senis. Esse resultado deve ser interpretado com cautela. Provavelmente o envelhecimento poderia retardar a resposta do tecido ósseo aos estímulos desencadeados pelo estresse. De maneira crônica, os efeitos poderiam ser mais severos nos idosos. Com relação aos hormônios sexuais, embora não tenham sido estatisticamente significantes, uma diminuição na concentração de testosterona nos grupos submetidos ao estresse pôde ser percebida. Para o estrógeno, houve um comportamento contrário entre o grupo de machos e o grupo de fêmeas – no primeiro, o estresse aumentou a concentração do hormônio, enquanto no segundo, diminuiu. A variação individual das observações foi muito ampla, e um melhor delineamento do modelo, possivelmente envolvendo um número maior de repetições, torna-se necessário para esclarecimento desta questão. Sobre as citocinas inflamatórias, o estresse também mostrou apenas efeito indireto no caso da IL-1 β , que diminuiu nos animais jovens, mas aumentou nos senis, e do TNF- α , que diminuiu nos machos e aumentou nas fêmeas. Diferenças na marcação imunoistoquímica foram percebidas apenas para RANKL em relação devido ao estresse. Provavelmente pelo fato de que as substâncias investigadas nesta última parte do trabalho sejam de expressão induzível, seu estudo pode tornar-se mais heterogêneo. Visto que o modelo proposto é inédito, alguns ajustes metodológicos fazem-se necessários. Estes dados são apresentados na forma de capítulos, e cada um contém um breve resumo em português e em inglês, além de um conjunto de palavras-chave.

ABSTRACT

VALENTE, Fabrício Luciani; D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Stress, aging and osteoporosis: An experimental study of bone loss, expression of proinflammatory cytokines and bone markers RANKL, RANK and OPG in rats.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-advisors: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo and Laércio dos Anjos Benjamin.

Aging, stress and osteoporosis are conditions that have taken great importance in modern world not only as reflection of lifestyle, but also due to the increasing life expectancy of populations. These conditions share many common mechanisms and modulating one of them may affect the others by direct and indirect means. Osteoporosis is a common disease among the elderly and, although its cause may be multifactorial, many processes associated with aging contribute to its pathogenesis. Chronic stress can impair bone mass and it can be considered an important factor that affects life quality for seniors, as does osteoporosis. This study aims to evaluate the effect of a chronic mild stress protocol on bone parameters in rats, and the role of sex and age on this process. To do that, male and female rats, 5 and 22-24 months old, were submitted to mild stressors during 28 days. We included cold, heat, immobilization, tilt cage, isolation, overnight illumination, and water and food deprivation; each stressor was applied four times during the period. Animals of both sexes, young and aged, were kept with water and feed at will, with no interventions, to serve as control. Rats were weighed at the beginning and at the end of the period. After euthanasia, rats had their bones and blood collected. Femur, tibia and lumbar vertebra were analyzed by densitometry. Biomechanical tests evaluated maximal strength, toughness and stiffness of the head and shaft of femoral head and diaphysis by bending test. Histomorphometric analysis provided trabecular bone volume from femoral head and vertebral body, and measures of cortical bone and marrow cavity from femoral diaphysis cross-section. Immunohistochemistry was performed to analyze expression of RANKL, RANK and OPG in femur and vertebra. From blood, ELISA detected testosterone, estradiol, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Stress was able to decrease body weight, regardless of sex and age. The protocol employed also showed ability to reduce many of the parameters assessed, and that could harm bone health. However, stress affected a greater number of variables among young than aged animals. This result should be interpreted with caution.

Probably aging could slow down bone response to the stimuli caused by stress. But with chronic stimuli, the effects of stress on bone metabolism could be more severe in the elderly. About sex hormones, although not statistically significant, a decrease in testosterone concentration in the groups subjected to stress could be perceived. Considering estradiol, there was an opposite behavior between the group of male and female group – in the former, stress increased hormone concentration, while in the latter hormone levels were decreased. Individual variations were wide, so a better delineation of the model makes necessary, possibly involving a larger number of samples. Stress also showed only an indirect effect on IL-1 β levels, which decreased in young animals but increased in the senile. TNF- α decreased in males and it increased in females after stress. Differences in RANKL expression assessed by immunohistochemistry were perceived only related to stress. Probably because of the inducible nature of those substances, their investigation may become more heterogeneous. Since the proposed model is a novel model, some methodological adjustments are made necessary. All these data are presented in chapters where summaries in Portuguese and English and a set of keywords can be found.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

O presente trabalho pretende abordar, de maneira simultânea, três importantes questões da atualidade: a osteoporose, o envelhecimento e o estresse. O avanço científico nas diversas áreas da biologia e em outras nas quais ela se apóia gerou uma grande quantidade de conhecimento, que trouxe consigo, naturalmente, novas questões a serem respondidas, novas hipóteses a serem testadas. Para que se prosseguissem as descobertas, a criação de especialidades dentro de especialidades tornou-se necessária. Mas, para cada ponto esclarecido, a ciência sempre se depara com vários pontos obscuros. E chegamos a um tempo em que os caminhos se cruzaram, o conhecimento, antes compartimentalizado para ser entendido, só progrediria convergindo o que um dia foi divergente (ou divergido), mesclando-se as especialidades, o que então chamamos de interdisciplinaridade.

Nas três questões abordadas por este trabalho, alguns aspectos são intuitivamente de fácil associação. Em humanos, por exemplo, um hormônio glicocorticóide é liberado na resposta ao estresse (MCEWEN, 2000), sua concentração sérica aumenta com a idade (BUCKINGHAM, 2000) e é um dos principais causadores de desequilíbrio do metabolismo ósseo (MANELLI e GIUSTINA, 2000; LAFAGE-PROUST et al., 2003; MCILWAIN, 2003). No entanto, o papel do glicocorticóide como ponto comum neste sistema precisa ser mais bem contextualizado e isso será discutido ao longo deste trabalho.

A questão da obra conjunta de diversas áreas do conhecimento vai bem mais além. Por exemplo, nos últimos anos do século passado, uma série de moléculas foi identificada por diferentes grupos de pesquisa atuando de forma independente na imunologia e na osteologia. Até que os cientistas perceberam que se tratavam exatamente do mesmo sistema de moléculas, neste caso, o sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG, que revolucionou o entendimento da fisiologia óssea, ao demonstrar que a ativação osteoclástica é feita por contato célula-célula com os osteoblastos, mostrando a ação acoplada dessas duas células ósseas, de funções tão opostas (ARRON e CHOI, 2000; WALSH e CHOI, 2003; BARON, 2004). Já se

conheciam diversos mecanismos comuns entre os sistemas ósseo e imune, mas aquela descoberta ampliou o campo de conhecimento de ambas as disciplinas e motivou a cunhagem do termo osteoimunologia (RHO et al., 2004). Outros termos já foram desenvolvidos neste sentido com o intuito de encorajar o estudo interdisciplinar de diversos processos fisiológicos ou patológicos, como psiconeuroimunologia (ADER, 2001) ou neuropsicosteologia (YIRMIYA et al., 2006).

Os três temas abordados neste trabalho têm uma relação direta com o aumento da esperança de vida – uma conquista que causa forte impacto na sociedade. Garantir qualidade de vida ao crescente número de idosos incorporados todos os anos na população é um grande desafio. Uma das conseqüências mais notáveis do envelhecimento é o aumento do número de casos das doenças relacionadas a ele e a osteoporose é uma delas. Com alta prevalência entre os idosos, a osteoporose é uma doença silenciosa até que se estabeleça um episódio de fratura, que na maioria das vezes torna-se um evento debilitante para o indivíduo (WHO, 2003). Outro fator que compromete a qualidade de vida dos idosos é o estresse, que pode predispor o organismo a diversas condições patológicas, como neoplasias e distúrbios cardíacos (VASTO et al., 2007; NASS et al., 2009). Como resposta ao estresse, o organismo estimula a liberação de glicocorticóides para a manutenção da homeostase, pela ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (MCEWEN, 2000). Os níveis deste hormônio são naturalmente mais elevados em mulheres e em idosos, e este aumento endógeno de glicocorticóide verificado com o envelhecimento já é suficiente para tornar os ossos mais suscetíveis a fraturas (DENNISON et al., 1999; REYNOLDS et al., 2005; WEINSTEIN et al., 2010). Eventos estressantes são recorrentes na vida de muitas pessoas, tornando crônica a solicitação da resposta adaptativa, ou seja, a ativação do eixo HPA (WAGER-SMITH e MARKOU, 2011), o que pode aumentar ainda mais o risco de comprometimento do metabolismo ósseo. Em modelo animal, Sandi e Touyarot (2006) mostraram que episódios de estresse ao longo da vida podem prejudicar a resposta cognitiva na velhice. O modelo de estresse moderado crônico (EMC) é utilizado para estudar em animais, principalmente murinos, alterações compatíveis com a depressão em humanos, com base na teoria de que esta doença é induzida por estresse (WILLNER, 1997). Utilizando este modelo, Yirmiya et al. (2006) mostraram que ele é capaz de induzir perda de massa óssea em camundongos de três meses de idade. Entretanto, faltam estudos que mostrem as relações entre estresse, envelhecimento e massa óssea, o que evidencia a necessidade de investigação neste contexto.

É importante ressaltar que os custos econômicos das fraturas osteoporóticas incluem os gastos diretos, como com a hospitalização e pós-operatório, e os indiretos, como o prejuízo sobre tarefas diárias, incluindo dias não trabalhados (COMPSTON, 2010). Em 2005, mais de 10 milhões de indivíduos apresentavam osteoporose nos EUA (SHEA e MILLER, 2005). As informações sobre o impacto econômico e social da osteoporose em países em desenvolvimento é geralmente escasso (ROCHA e RIBEIRO, 2003), mas os indivíduos suscetíveis são cada vez mais numerosos. A população idosa brasileira, ou seja, a parcela da população composta por indivíduos com mais de 60 anos, aumentou de três milhões na década de 1960 para 14 milhões em 2002 (LIMA-COSTA e VERAS, 2003). Em 2001, os idosos compreendiam 14,3% da população adulta no Brasil e 33,5% das internações hospitalares, respondendo por 37,7% das despesas com saúde, o que significava 1,2 bilhões de reais (PEIXOTO et al., 2004).

1.2 Objetivos

Para fomentar o estudo nestas áreas, o presente trabalho avalia parâmetros ósseos, bem como outros fatores envolvidos no metabolismo ósseo, em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, jovens (adultos de seis meses de idade) e senis (entre 22 e 24 meses de idade) submetidos a um protocolo de EMC aplicado durante 28 dias.

Os parâmetros ósseos foram avaliados por densitometria no fêmur, na vértebra e na tíbia; histomorfometria, em que se verificaram as medidas da seção transversal da diáfise do fêmur e o volume de osso trabecular na cabeça femoral e no corpo vertebral; e testes biomecânicos de flexão da diáfise e da cabeça do fêmur. Do sangue, foram obtidas, por ensaios imunoenzimáticos, as concentrações de estradiol, testosterona e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . A técnica de imunistoquímica foi utilizada em cortes histológicos nas mesmas regiões em que foram obtidos histomorfometricamente os valores para o volume trabecular ósseo. Neste ensaio foi verificada a expressão óssea de RANKL, RANK e OPG. O peso corporal dos animais também foi avaliado.

1.3 Distribuição do conteúdo

Esta tese foi elaborada em capítulos. O primeiro capítulo traz uma breve revisão bibliográfica sobre estresse, envelhecimento e osteoporose. O segundo relata de forma mais detalhada a metodologia completa empregada no experimento, para que sirva de base para trabalhos futuros. Os três capítulos seguintes foram escritos na forma de artigo e tratam exclusivamente do peso corporal e dos parâmetros de avaliação óssea dos animais, segundo o sexo, a idade e a resposta ao estresse crônico. O primeiro deles, intitulado “Análises densitométrica, histomorfométrica e biomecânica de ossos de ratos machos e fêmeas, jovens e senis, para avaliação dos efeitos do sexo e da idade sobre a massa óssea” traz as diferenças naturais encontradas entre os animais utilizados neste experimento, independente de tratamento. Existem muitos modelos empregados no estudo do envelhecimento, cada um com sua peculiaridade. Por isso, é importante a descrição completa de cada um, mesmo que se distingam levemente entre si. Estas informações são necessárias para o estabelecimento de um grupo controle apropriado quando são utilizados tratamentos ou outra intervenção qualquer, como será discutido ao longo dos artigos. O segundo artigo, que corresponde ao quarto capítulo, recebeu o nome “Efeito do estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos adultos machos e fêmeas” e, para demonstrar esses efeitos, foram selecionados os animais de seis meses de idade, adultos saudáveis, minimizando as interferências que outras condições poderiam exercer, como, por exemplo, os efeitos do envelhecimento, que são então tratados na próxima seção. Intitulado “Efeito do estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos senis”, o terceiro artigo traz os mesmos parâmetros após aplicação do mesmo protocolo utilizado do artigo anterior, porém aqui são empregados ratos de 22 a 24 meses de idade. O sexto e último capítulo, também na forma de artigo, foi nomeado “Efeito do estresse moderado crônico sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias, hormônios sexuais e dos marcadores ósseos RANKL, RANK e OPG”.

Os artigos apresentados nesta tese não serão submetidos à publicação em um único periódico científico. Por isso, para que seguissem uma padronização interna, foi adotada a formatação sugerida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) adaptada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (PPG/UFV) (PINTO et al., 2010). Os capítulos elaborados na forma de artigo estão subdivididos nas seguintes seções: introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas. Cada capítulo traz ainda resumo em português e em inglês, além de um conjunto de palavras-chave. Posteriormente, os artigos serão convertidos segundo as normas específicas dos periódicos aos quais serão submetidos.

1.4 Referências bibliográficas

ADER, R., Psychoneuroimmunology, In: SMELSER, N. J.; BALTES, P. B. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**. Pergamon: Oxford, 2001, p.12422-12428.

ARRON, J. R.; CHOI, Y. Bone versus immune system. **Nature**, v. 408, p.535-536, 2000.

BARON, R. Arming the Osteoclast. **Nature Medicine**, v.10, n.5, p.458-460. 2004.

BUCKINGHAM, J. C. Effects of Stress on Glucocorticoids. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol.2. Academic Press: San Diego, 2000, p.190-197.

COMPSTON, J. Osteoporosis: Social and Economic Impact. **Radiol Clin N Am**, v.48, p.477-482, 2010.

DENNISON, E.; HINDMARSH, P.; FALL, C.; KELLINGRAY, S.; BARKER, D.; PHILLIPS, D.; COOPER, C. Profiles of endogenous circulating cortisol and bone mineral density in healthy elderly men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, n.9, p.3058-3063, 1999.

LAFAGE-PROUST, M. H.; BOUDIGNON, B.; THOMAS, T. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathophysiology Data and Recent Treatments. **Joint Bone Spine**, n. 70, v. 109-118. 2003.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde Pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.3, p.700-701, 2003.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, p.79-85. 2000.

MCEWEN, X. X. Definitions and Concepts of Stress. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol.3. Academic Press: San Diego, 2000, p.653.

MCILWAIN, H. H. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **Preventive Medicine**, v.36, p.243-249. 2003.

NASS, R.; JOHANSSON, G.; CHRISTIANSEN, J.S.; KOPCHICK, J.J.; THORNER, M.O. The aging population – Is there a role for endocrine interventions? **Growth Hormones & IGF Research**. V.19. p.89-100, 2009.

PEIXOTO, S. V.; GIATTI, L.; AFRADIQUE, M. E.; LIMA-COSTA, M. F. Custo das internações hospitalares entre idosos brasileiros no âmbito do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, n.4, p.239-246, 2004.

PINTO, A. R. et al. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos**. Viçosa, MG, 2010. 88 p. Disponível em: <<http://www.bbt.ufv.br/>>. Acesso em: 17 de maio de 2011.

REYNOLDS, R. M.; DENNISON, E. M.; WALKER, B. R.; SYDDALL, H. E.; WOOD, P. J.; ANDREW, R.; PHILLIPS, D.; COOPER, C. Cortisol secretion and rate of bone loss in a population-based cohort of elderly men and women. **Calcified Tissue International**, v.77, p.134-138, 2005.

RHO, J.; TAKAMI, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. **Molecular and Cells**, v. 17, p. 1-9. 2004.

ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, A. R. Low Incidence of Hip Fractures in an Equatorial Area. **Osteoporosis International**, v. 14, p. 496-499. 2003.

SANDI, C.; TOUYAROT, K. Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates. **Neurobiology of Aging**, v.27, p.128-140, 2006.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal Function and Structure: Implications for Tissue-Target Therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.945-957. 2005.

VASTO, S.; CANDORE, G.; BALISTRERI, C.R.; CARUSO, M.; COLONNA-ROMANO, G.; GRIMALDI, M.P.; LISTI, F.; NUZZO, D.; LIO, D.; CARUSO, C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**. v.128; p. 83-91. 2007.

WAGER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: A repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.35, p.742-764, 2011.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE Axis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, p.251-263. 2003.

WEINSTEIN, R. S.; WAN, C.; LIU, Q.; WANG, Y.; ALMEIDA, M.; O'BRIEN, C. A.; THOSTENSON, J.; ROBERSON, P. K.; BOSKEY, A. L.; CLEMENS, T. L.; MANOLAGAS, S. C. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. **Aging Cell**, v.9, p.147-161, 2010.

WILNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v.134, p.319-329, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis. **WHO Technical Report Series**, v. 921, 193p. 2003.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I.; BAJAYO, A.; KREISEL, T.; FELDMAN, S.; TAM, J.; TREMBOVIER, V.; CSERNUS, V.; SHOHAMI, E.; BAB, I. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.45, p.16876-16881, 2006.

2 CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: ENVELHECIMENTO, ESTRESSE E OSTEOPOROSE

2.1 Resumo

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o envelhecimento, o estresse e a osteoporose. O envelhecimento é um evento de grande importância, pois o aumento da esperança de vida das populações reflete em um aumento de doenças relacionadas ao envelhecimento, o que implica em grandes custos sociais e no comprometimento da qualidade de vida da população. O impacto do tempo sobre o organismo envolve uma interação complexa no nível das células, dos órgãos e dos sistemas, com fatores ambientais, resultando em uma diminuição das funções fisiológicas. Ratos e camundongos são amplamente utilizados como modelos para estudo do envelhecimento, embora apresentem algumas divergências com os processos observados em humanos. O estresse é uma perturbação de qualquer natureza, capaz de incitar uma resposta do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, com o objetivo de restabelecer a homeostase. Um dos principais hormônios secretados é o glicocorticóide, que atua de maneira sistêmica, visto que seus receptores são amplamente difundidos pelo organismo. Embora a resposta ao estresse seja uma resposta adaptativa, muitas vezes ela pode causar prejuízos ao organismo. A depressão, por exemplo, pode desenvolver-se por uma ativação contínua do eixo HPA. Uma vez que a resposta ao estresse pode ser estimulada por vários tipos de fatores, os modelos de indução em animais são muito diversos, empregando como estressores estímulos físicos, químicos e psicológicos. A osteoporose é uma doença que compromete a saúde dos ossos, tornando-os mais propensos a fraturas. A prevalência da doença é crescente e tem alta correlação com o aumento da esperança de vida. As principais causas estão relacionadas à deficiência de estrógeno, como ocorre nas mulheres após a menopausa; ao próprio envelhecimento, que compromete diversos eventos relacionados ao metabolismo ósseo; e de maneira secundária aos tratamentos crônicos com glicocorticóides. Estas três condições podem ser mimetizadas em modelos animais para o estudo da perda de massa óssea.

Palavras-chave: envelhecimento, estresse, osteoporose, revisão bibliográfica, modelo animal.

2.2 Abstract

AGEING, STRESS AND OSTEOPOROSIS: A REVIEW

Ageing of population is a very important event because as life expectancy increases, diseases related to ageing process become more frequent and that means a strong impact on social costs and impairment of welfare. Effects of time on the organism involves a complex interaction at levels of cells, organs and systems, with environmental factors, resulting in an impairment of body function. Rats and mice are widely used as models for the study of aging, although they present some differences when compared with human ageing process. Stress is a disturbance of any kind capable of eliciting a response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with the aim of restoring homeostasis. Glucocorticoid is one of the main hormones secreted in response of stress and they act systemically, since their receptors are widely distributed throughout the body. Although stress response represents an adaptive response, it can often lead to some damage. Depression, for example, can develop from a continuous activation of HPA axis. Since various factors can induce stress, animal models for its study work with many possibilities, employing physical, chemical and psychological stimuli. Osteoporosis is a disease that impairs bone health, increasing fractures susceptibility. The prevalence of osteoporosis is growing and it is highly correlated with increased life expectancy. The main causes of osteoporosis are related to (1) estrogen deficiency, as it is seen in women after menopause, (2) aging itself, impairing several events related to bone metabolism, and (3) secondarily to chronic treatment with glucocorticoids. Those three conditions can be mimicked in animal models for the study of bone loss.

Keywords: aging, stress, osteoporosis, review, animal model.

2.3. Introdução

Este capítulo traz uma revisão bibliográfica sobre as três áreas abordadas nesta tese: o estresse, a osteoporose e o envelhecimento. O objetivo é apresentar a base teórica na qual se apóia o desenvolvimento desta pesquisa. Além de conceitos gerais, o capítulo discute a epidemiologia, a fisiologia e a patologia dos principais eventos envolvidos, bem como os modelos animais comumente empregados em seu estudo.

2.4 Senilidade

2.4.1 Definições e epidemiologia

O envelhecimento pode ser definido como declínio das funções fisiológicas relacionado à idade (AUSTAD, 2005). Embora seu início, muitas vezes, seja tido como o ponto de inflexão na curva de mortalidade por faixa etária ou marcado pelo amadurecimento sexual, dado que o processo de senescência é estocástico e cumulativo, o envelhecimento ocorre desde as fases mais iniciais da vida (MILNE, 2006). Van de Ven et al. (2007) sugerem que a definição de envelhecimento deveria englobar pelo menos quatro componentes: mecanismos básicos (incluindo danos por oxidação molecular), base genética (definindo a susceptibilidade a tais danos), tempo de exposição aos danos, e adaptação secundária do organismo na tentativa de contrabalancear esses efeitos.

A população idosa, que, no Brasil, compreende os indivíduos com mais de 60 anos, representa uma importante parcela da sociedade. Só no Brasil, cerca de 650 mil pessoas são incorporadas à parcela da população idosa todos os anos. Nos últimos 40 anos, a população brasileira de idosos aumentou cerca de 500% (três milhões em 1960 e 14 milhões em 2002) (LIMA-COSTA e VERAS, 2003). Segundo o IBGE (2010), entre 1980 e 2009, a expectativa de vida ao nascer no Brasil aumentou em 10,6 anos, passando de 62,57 para 73,17 anos. Aos 60 anos, a expectativa de vida era de 15,2 anos para homens e de 17,6 para mulheres em 1980, e aumentou para 19,5 e 22,8, respectivamente. Em 2020, estima-se um tempo médio de vida de 72,47 anos para homens e 79,80 para mulheres (IBGE, 2008). Em estudo retrospectivo, Lima-Costa et al. (2004) confirmaram a tendência na diminuição da taxa de mortalidade em idosos no Brasil, no período de 1980 a 2000, principalmente em mulheres. Esses dados são consistentes com o aumento da população idosa feminina, num fenômeno conhecido como “feminização do envelhecimento”; e com o crescimento da composição dos idosos em geral na população.

O aumento da esperança de vida ao nascer é uma constante conquista, porém manter ou melhorar a qualidade de vida no envelhecimento é um desafio cada vez maior em todo o mundo. Um dos aspectos da mudança na pirâmide populacional é a maior

expressão de doenças relacionadas ao envelhecimento (LIMA-COSTA e VERAS, 2003). Em 2001, os idosos representavam 8,5% da população geral brasileira e responderam por 18,3% das internações hospitalares (LOYOLA FILHO et al., 2004). Entre adultos, os idosos compunham, no mesmo período, 14,3% da população e 33,5% das internações, respondendo por 37,7% das despesas pagas por elas, o que significa 1,2 bilhões de reais (PEIXOTO et al., 2004).

As cinco principais causas de morte na população dos EUA, em cada ano entre 2004 e 2007, foram: doenças cardíacas, neoplasias, acidente vascular encefálico, doenças crônicas do trato respiratório inferior e mortes acidentais. Ainda constam entre as 15 principais causas: doença de Alzheimer, distúrbios renais, suicídio, doenças crônicas do fígado, doença de Parkinson e Diabetes (MINIÑO et al., 2007; KUNG et al., 2008; HERON et al., 2009; XU et al., 2010). A maior parte desta lista é de particular importância entre idosos. Outra característica das doenças em idosos é a maior taxa de co-morbidade que em jovens (FERRUCCI et al., 2008).

Lloyd-Sherlock (2000) ressalta que a população idosa não forma um grupo homogêneo em termos de experiências, necessidades e capacidades e que as políticas adotadas em um local podem não ser eficazes em outro com diferentes condições culturais ou socioeconômicas. Assim, o autor chama a atenção para a necessidade de aprofundamento dos estudos epidemiológicos e demográficos em países onde os dados sobre o assunto são mais escassos.

2.4.2 Fisiologia do envelhecimento

Lipman (1997) ressalta a importância da diferença entre o envelhecimento e as doenças relacionadas ao envelhecimento, porém lesões cumulativas podem ser usadas como marcadores do avanço da idade. O impacto da idade sobre o organismo é resultado de uma complexa interação entre os processos de envelhecimento no nível das células, dos órgãos e dos sistemas, com fatores ambientais, como nutrição, infecção ou trauma. As mudanças ocasionadas pelo envelhecimento podem ser divididas em três grupos: manutenção de processos homeostáticos básicos como controle da temperatura corporal, pH e volume sanguíneo; diminuição da massa dos órgãos; e declínio da reserva funcional (DODDS, 2006). De maneira geral, processos degenerativos e a

substituição de parênquima funcional por tecido conjuntivo fibroso são considerados manifestações do envelhecimento em mamíferos (FERDER et al., 2002). Sabe-se que a quantidade de danos ao DNA aumenta com a idade e este pode ser o fator responsável pelo fenótipo da senescência: danos irreversíveis podem estimular a apoptose levando à perda de células funcionais. Esta injúria sobre o material genético de um organismo é provocada por diversos fatores com efeito cumulativo, como os raios ultravioletas e a ação de espécies reativas de oxigênio (WARNER, 2007).

O estresse oxidativo é considerado o principal agente causador de lesões cumulativas no DNA com o avançar da idade. Modelos animais mostram que órgãos e tecidos com menor capacidade replicativa têm maior prejuízo com o acúmulo de lesões causadas no material genético pelas espécies reativas de oxigênio (MØLLER et al., 2010). Adicionalmente, a ativação contínua dos sistemas de reparação do DNA pode causar modificações epigenéticas, que, por sua vez, podem promover uma variedade de alterações transcricionais e funcionais relacionadas à idade (SINCLAIR e OBERDOERFFER, 2009). Segundo Meites (1988), o genoma atua no envelhecimento do organismo através de mecanismos homeostáticos e integrativos do corpo, principalmente os sistemas neuroendócrino, imunológico e de comunicação célula-célula. Agentes ambientais podem interagir diretamente com o genoma ou pelo sistema neuroendócrino.

Uma célula senescente é caracterizada pela perda da capacidade de divisão celular e hiporresponsividade aos estímulos externos. Receptores acoplados à proteína G e receptores tirosina quinase são os dois principais mecanismos pelos quais tais estímulos são efetivados. O envelhecimento pode alterar a composição e a estrutura das membranas biológicas, afetando assim a atividade das proteínas envolvidas na sinalização celular (ALEMANY, 2007). Não apenas as vias de sinalização celular são afetadas, mas também as interações cruzadas entre elas. Estas alterações dependentes da idade provavelmente são deletérias à homeostase celular e conseqüentemente podem contribuir para o estabelecimento de processos patológicos (CARLSON et al., 2008).

Outro fator que torna a célula senescente é o encurtamento do telômero. Diversos estudos mostram que um significativo número de processos patológicos associados à idade, como doenças cardíacas e mal de Alzheimer, bem como estresse psicológico, podem ter relação com o encurtamento do telômero (JEYAPALAN e SEDIVY, 2008). Telômeros são seqüências de nucleotídeos repetidas nas extremidades dos cromossomos eucariotos, com a função de estabilizá-lo (NELSON e COX, 2004). A

atividade da telomerase, que resulta no alongamento do telômero, pode ter grande importância na homeostase imunológica, visto que os linfócitos também estão sujeitos à senescência replicativa (IANCU et al., 2008).

No sistema nervoso central (SNC), umas das alterações mais importantes que surgem com o envelhecimento é a diminuição do número de sinapses. Embora o processo seja multifatorial, o declínio progressivo da competência metabólica das mitocôndrias representa um fator chave na deterioração sináptica (BERTONI-FREDDARI et al., 2008). Déficits cognitivos são comuns com o avançar da idade, porém não são exclusivamente dependentes dele. Evidências fornecidas por modelos animais mostram que tais déficits estão relacionados à rede de processamento da informação dentro do neurônio e não necessariamente à perda destas células (GALLAGHER et al., 2003).

Durante o processo de envelhecimento, mulheres passam pelo estágio da menopausa, que não apenas marca o fim do período reprodutivo, mas também aumenta o risco de desenvolvimento de doenças, como osteoporose, cardiopatias e distúrbios cognitivos (BRANN e MAHESH, 2005; NEAL-PERRY et al., 2010). A depleção de oócitos sempre foi considerada uma marca característica da transição para a menopausa, porém é crescente o número de evidências científicas que indicam que disfunção do eixo HPA pode ser responsável pela senescência reprodutiva (BRANN e MAHESH, 2005; NEAL-PERRY et al., 2010). Com a menopausa, a testosterona proveniente das adrenais passa a ser a principal fonte de estrógeno para as mulheres (LEBOFF e GLOWACK, 1999). Apesar de não apresentarem uma alteração hormonal tão brusca como ocorre nas mulheres, os níveis de andrógenos livres no sangue dos homens diminuem progressivamente a partir de cerca de 40 anos de idade (MASSON et al., 2006; HARVEY e BERRY, 2009).

Com o avanço da idade, ocorre um declínio da função do sistema imunológico. As alterações podem ser primárias, ou seja, um declínio intrínseco dependente da idade; ou secundárias, relacionadas a outras condições presentes nos idosos, como doenças, uso de medicamentos, atividade física, entre outros (WICK e GRUBECK-LOEBENSTEIN, 1997). A deterioração do sistema imunológico torna os idosos mais susceptíveis a doenças infecciosas e possivelmente ao câncer. Tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa sofrem efeitos deletérios durante o envelhecimento. As alterações na resposta dos linfócitos T são consequência do declínio da timopoiese,

exposição crônica ou recorrente a antígenos e alterações intrínsecas aos linfócitos envelhecidos (LINTON et al., 2006).

Quanto à imunidade inata, o avanço da idade reduz a capacidade fagocítica, a geração de radicais na explosão respiratória e o tráfego das células dendríticas; entretanto, as concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF aumentam (STRAUB et al., 2001). Em mulheres, muitas dessas alterações têm sido relacionadas à menopausa (GAMEIRO et al., 2010). Em relação à imunidade adaptativa, o número de células ‘virgens’ está diminuído enquanto aumenta o de células de memória. Outra observação interessante é uma mudança na tendência da resposta, de Th1 para Th2 (STRAUB et al., 2001). Gonzalo-Calvo et al. (2010) sugerem que falhas nos mecanismos antioxidantes e de degradação proteolítica levam a acúmulo de proteínas danificadas, que, por sua vez, incitam uma resposta inflamatória, induzindo a expressão de TNF- α .

2.4.3 Modelos experimentais para o estudo do envelhecimento

Ratos e camundongos têm sido amplamente utilizados como modelos animais para a pesquisa biomédica, inclusive para o estudo do envelhecimento humano. Tais modelos são bem estabelecidos fornecendo resultados satisfatórios e têm a vantagem de que ratos e camundongos têm curto período de vida, tornando mais rápida a obtenção dos resultados (MAGALHÃES, 2006). Os primeiros modelos utilizando roedores para o estudo do envelhecimento datam da década de 1930, quando se percebeu que a restrição calórica prolongava consideravelmente o tempo de vida dos animais (SPROTT e AUSTAD, 2006). Nas espécies em geral, o tempo máximo de vida é diretamente proporcional ao tamanho do corpo, embora haja exceções. Em média, considera-se que a idade de maturidade sexual em humanos e ratos seja de 13 e 0,25 anos, respectivamente, e o peso, como medida padrão para tamanho corporal, de 60 e 0,2Kg (MAGALHÃES, 2006). Ratas não sofrem menopausa, mas começam a apresentar irregularidade no ciclo estral entre nove e 12 meses até se tornarem acíclicas, em um diestro persistente por volta dos dois anos de idade. Entretanto, uma diferença fundamental entre espécies ocorre nesse período: as ratas apresentam níveis de estrógeno ligeiramente aumentados enquanto mulheres e camundongos fêmeas mostram declínio dos níveis deste hormônio (MAFFUCCI e GORE, 2006). Segundo Miller

(2006), existem três desvantagens quanto ao uso de animais muito velhos: eles são caros, doentes e pouco representativos, pois se torna difícil posicionar os dados para projeção em humanos.

Nos últimos anos, diversos modelos experimentais para o estudo do envelhecimento têm sido desenvolvidos com base na geração de camundongos mutantes que apresentam senescência acelerada. Vários tipos de mutantes já foram produzidos com defeitos em proteínas envolvidas no metabolismo ou função do DNA e produzem fenótipos semelhantes ao envelhecimento normal em humanos (WARNER, 2007).

2.5 Estresse

2.5.1 Definições: estresse e estressores

Na literatura científica, várias são as definições para estresse, mas de maneira geral, todas convergem para um ponto comum – a ativação do eixo HPA para a restauração da homeostase (LEVINE, 2005). Um estressor pode ser um insulto físico, como trauma, barulho, calor ou frio, mas também pode incluir experiências primariamente psicológicas, como conflitos interpessoais, frustração e eventos inesperados (MCEWEN, 2007). A percepção e a reação aos diversos fatores considerados estressores é muito variável, pois dependem da plasticidade fenotípica, que é determinada pela interação ambiente/genoma, incluindo, além da variação genética, idade, gênero, contato prévio com o estressor, e outros (ANISMAN e MATHESON, 2005; LEVINE, 2005). Os estressores podem ser classificados de maneira geral em: psicológicos, físicos, ou metabólicos (ANISMAN e MATHESON, 2005). Os efeitos do estresse manifestam-se em quatro domínios - o fisiológico, o comportamental, os que envolvem a função cognitiva, e as alterações subjetivas (STEPTOE, 2000). Dados provenientes de estudos com ratos, primatas não-humanos e humanos revelam que os eventos ocorridos nos primeiros períodos de vida influenciam os circuitos neurais adultos na resposta ao estresse (LEVINE, 2005). Em ratos, já foi demonstrado que mesmo que o estresse seja aplicado na mãe durante a gestação, os filhotes podem sofrer seu efeito ao longo da vida (MUELLER e BALE, 2006).

2.5.2 Fisiologia do estresse

A resposta ao estresse permite ao organismo adaptar-se a alterações adversas. A ativação do eixo HPA também estimula o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) para uma rápida resposta de adaptação. Funções reprodutivas, de crescimento e neurovegetativas, como sono e alimentação são provisoriamente suspensas para o melhor redirecionamento dos esforços (PARDON, 2007). O eixo HPA controla a secreção de

glicocorticóides pelo córtex adrenal. É parte de um sistema central de atuação do hormônio liberador de corticotropina (CRH), que parece ser responsável pela coordenação da resposta comportamental, neuroendócrina, autonômica e imunológica a alterações da homeostase. O eixo HPA segue o ritmo circadiano, é responsivo a estressores e sensível a retroalimentação por corticosteróide (DALLMAN et al., 2000). Os neurônios que produzem o CRH no núcleo paraventricular hipotalâmico formam a base da atividade do eixo HPA. Tais neurônios co-expressam vasopressina, que potencializa o efeito do CRH (BAO et al., 2008).

Os receptores para glicocorticóides estão amplamente distribuídos no organismo. Encontram-se no citoplasma, em sua forma inativa, em um complexo protéico que inclui as proteínas de choque térmico HSP90 e HSP70. Quando o glicocorticóide liga-se ao seu receptor, ele transloca-se para o núcleo, onde interage com um promotor do gene-alvo (MCLAUGHLIN et al., 2002; LANNA et al., 2003). Os glicocorticóides também atuam de uma forma não-genômica e rápida por interações com moléculas envolvidas em sinalização transducional (PATSCHAND et al., 2001; MCLAUGHLIN et al., 2002). Em humanos, o principal glicocorticóide secretado pelas adrenais é o cortisol, ou hidrocortisona. O efeito metabólico mais bem conhecido dos glicocorticóides é a estimulação da gliconeogênese pelo fígado. Como resultado, há um aumento no estoque de glicogênio pelas células hepáticas, permitindo que outros hormônios glicolíticos, como a epinefrina, mobilizem glicose quando necessário. Os glicocorticóides operam de duas formas no organismo. Na primeira forma, mantêm a atividade basal do sistema HPA e controla a sensibilidade ao estresse, além de coordenar os eventos circadianos, como o sono e a alimentação. Na segunda forma, os glicocorticóides promovem a adaptação ao estresse e, por retroalimentação, estimulam a terminação da atividade do eixo HPA induzida pelo estresse (DE KLOET et al., 1998). Os glicocorticóides liberados na ativação do eixo HPA regulam sua própria síntese e secreção por mecanismo de retroalimentação na adrenal, na pituitária e no hipotálamo. Além disso, eles suprimem os níveis de norepinefrina, o mais potente estimulador do CRH (PACAK e MCCARTY, 2000).

A estimulação contínua do eixo HPA também pode contribuir para o desenvolvimento da chamada Síndrome Metabólica, que inclui obesidade visceral, resistência a insulina e dislipidemia; pontos comuns entre diabetes tipo 2 e risco de doenças cardiovasculares (ROSMOND, 2005).

O estresse tem grande influência sobre a esperança e a qualidade de vida dos idosos. Estresse e envelhecimento compartilham de alguns mecanismos comuns, em que processos oxidativos destacam-se como ponto central. (PARDON, 2007). Em ambos os sexos, níveis séricos de cortisol aumentam com a idade; a resposta ao estresse nos idosos pode mostrar-se mais demorada, porém mais prolongada (BUCKINGHAM, 2000). Sandi e Touyarot (2006) mostraram em modelo animal, que o estresse ao longo da vida pode predispor a prejuízos da função cognitiva na velhice.

O sistema nervoso central e o sistema imunológico atuam em conjunto para a defesa do organismo e regulam-se mutuamente. O primeiro, da mesma forma que controla todos os órgãos periféricos: por meio do SNA, cuja inervação alcança as diversas partes do corpo; e pelo sistema de fatores hormonais produzidos no hipotálamo. O sistema imunológico, por sua vez, induz resposta central por meio das citocinas (MAIER e WATKINS, 1998; ADER, 2001). Assim, os sistemas imune, endócrino e nervoso interagem entre si por meio de citocinas, hormônios e neurotransmissores, dependentes de receptores específicos (STRAUB et al., 2001).

Os estressores podem tanto inibir quanto estimular o sistema imune, mas o conhecimento corrente nesta área não permite prever o efeito de determinado estressor em cada função imunológica (PRUETT, 2003). O glicocorticóide liberado pelo estresse, por seu efeito antiinflamatório, pode ainda proteger o organismo do efeito do aumento das citocinas pro-inflamatórias (ROHLEDER et al., 2002). Linfócitos T de camundongos submetidos a estresse por imobilização expressam mais de 100 proteínas diferentes dos linfócitos do grupo controle em eletroforese bidirecional (DOMÍNGUEZ-GERPE e LEFKOVITS, 1996).

O CRH possui atividade pró-inflamatória e atua pela estimulação dos mastócitos, podendo participar no desenvolvimento de doenças infecciosas, auto-imunes, alérgicas ou neoplásicas (ELENKOV e CHROUSOS, 1999; CROMPTON et al., 2003).

A susceptibilidade a doenças é diferente entre homens e mulheres e isso pode ser explicado, em parte, pela variação da resposta ao estresse (KAJANTIE e PHILLIPS, 2006). A atuação dos esteróides sexuais no eixo HPA é evidente, mas nem todas as diferenças entre os sexos na resposta ao estresse podem ser explicadas por ela (RIVIER, 1999). Mulheres apresentam concentração sérica de cortisol relativamente mais alta que homens e a ativação do eixo HPA é altamente influenciada pela variação hormonal do ciclo menstrual (BUCKINGHAM, 2000). Essa variação reflete-se, portanto, na resposta

ao estresse, que também apresenta padrões diferentes na gravidez e na menopausa (KAJANTIE e PHILLIPS, 2006). Segundo Stroud et al. (2002), os homens apresentam resposta mais acentuada quando o fator estressor envolve realização ou conquista e as mulheres, maior quando envolve rejeição social.

2.5.3 Modelos Experimentais para o Estudo da Resposta ao Estresse

Os modelos experimentais utilizados para o estudo do estresse são tão diversos quanto os tipos de estressores e os padrões de respostas. Os principais animais empregados nos modelos são os roedores. Estressores físicos e/ou psicológicos são utilizados nos estudos, incluindo contenção, choque elétrico, natação, frio, barulho; e sua aplicação pode ser crônica ou aguda (OTTENWELLER, 2000).

Variações de temperatura também são estressores constantemente utilizados, apesar de os animais apresentarem adaptabilidade, dependendo do esquema de aplicação (OTTENWELLER, 2000). Animais submetidos ao calor como estressor têm sua habilidade de regulação térmica alterada e apresentam dificuldade de manter a temperatura corporal quando são, em seguida, desafiados por frio. Tal alteração, entretanto, é reversível (SZELÉNYI et al., 1996). Sugama et al. (2010) utilizaram apenas o frio como estressor e notaram que houve ativação morfológica da microglia e aumento da expressão de IL-1 β no cérebro. O protocolo empregado pelos autores para a aplicação do frio consistiu em manter os animais em uma sala climatizada a 4°C por 2h. Diversos estudos mostram que o estresse por calor pode causar edema cerebral, além de inflamação e necrose no SNC, em modelos animais (AHMED, 2005). Alterações na microglia também foram observadas por Tynan et al. (2010), utilizando apenas a imobilização como estressor. Outros estudos também lançam mão da associação de dois ou mais estressores diferentes. Klenerová et al. (2003) estudaram em ratos o efeito prejudicial da associação de dois estressores na aprendizagem: a imobilização e o frio, que consistiu na imersão dos animais em água por 1h. Iluminação noturna ou inversão de fotoperíodo também são utilizadas como estressores. Camundongos fêmeas submetidas à iluminação contínua apresentaram maior incidência de neoplasias e os distúrbios do ciclo estral relacionados à idade surgiram mais cedo. Além disso, esses

animais apresentaram menor tempo de vida que o grupo submetido a ciclos de 12 horas de luz/escuro (ANISIMOV et al., 2004).

Diversos trabalhos em animais indicam que o estresse pode provocar perda de peso, muitas vezes relacionada a anorexia (MARIN et al., 2007; GARCIA et al., 2009; TYNAN et al., 2010; GONG et al., 2011). Por outro lado, dados epidemiológicos sugerem que o estresse está de alguma forma associado a sobrepeso e obesidade. Em um modelo que utiliza ratos, com a formação de colônias contendo ambos os sexos, uma vez que um dos machos desenvolve hierarquia dominante, os subordinados desenvolvem progressivamente características de obesidade, em partes devido a alterações neuroendócrinas e no consumo de alimento (TAMASHIRO et al., 2007). Também em ratos, choque elétrico na pata utilizado como estressor associado à restrição calórica pode induzir comportamento similar à compulsão alimentar dos humanos. Em trabalho realizado por Artiga et al. (2007), a restrição alimentar não provocou perda de peso considerável, enquanto o estresse sozinho reduziu a adiposidade em 35%, o que não foi percebido na associação dos dois fatores. Além disso, neste tipo de comportamento, tanto humanos quanto ratos apresentam elevados níveis de glicocorticóide. O aumento de peso relacionado a estresse visto nos modelos animais é congruente com observações feitas em humanos. Serlachius et al. (2007), por exemplo, observaram que alunos do Reino Unido aumentam seu peso corporal no primeiro ano da faculdade, o que pode ter correlação com estresse, principalmente em mulheres. De fato, o estresse pode alterar a alimentação tanto negativa quanto positivamente, visto que a noradrenalina e o cortisol, ambos aumentados em condições de estresse, têm o poder de inibir e estimular o apetite, respectivamente (TORRES e NOWSON, 2007).

2.6 Osteoporose

2.6.1 Ossos e Tecido Ósseo

Os ossos são órgãos formados predominantemente por tecido ósseo, mas também por tecido cartilaginoso, nervoso, sangüíneo e hematopoiético. Interligados pelas articulações, os ossos formam o esqueleto, um sistema que tem por funções: (1) a sustentação das partes moles do corpo; (2) a constituição de um sistema de alavancas; (3) o alojamento e a proteção de órgãos vitais, como o SNC, o coração e a medula óssea; e (4) a reserva de cálcio e fosfato para o organismo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O osso é um órgão leve, rígido, de alta força tênsil e não quebradiço por causa de sua combinação de tecido ósseo compacto ou cortical e osso esponjoso ou trabecular (NG et al., 1997). No osso cortical maduro, as lamelas de matriz calcificada são concêntricas a um canal vascular formando o sistema haversiano ou ósteon. O osso esponjoso é uma rede de trabéculas preenchidas por medula óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). As trabéculas não apresentam vascularização dentro da matriz, de forma que a irrigação é feita a partir da medula óssea subjacente. Neste tipo de osso, as lamelas seguem a curvatura geral da superfície óssea (SHEA e MILLER, 2005).

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, composto por células e uma matriz constituída por substâncias orgânicas e inorgânicas. As principais células do tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica e participam da sua mineralização. Têm origem mesenquimal com precursores em comum com condrócitos, adipócitos e linfócitos. Os precursores dos osteoblastos podem também originar-se de pericitos (MANOLAGAS, 2000). Os osteoblastos são encontrados em sua forma inativa revestindo o osso em uma camada de tecido conjuntivo tanto externa quanto internamente (respectivamente o periósteo e o endósteo). Ao tornarem-se ativos, os osteoblastos passam a sintetizar a matriz orgânica, composta principalmente por colágeno do tipo I, e depositá-la ao seu redor. Com a mineralização da matriz, estas células ficam enclausuradas em lacunas, tornando-se então osteócitos, as células

maduras, localizando-se por toda a matriz. Entretanto, os osteócitos não perdem a conexão entre si e a superfície óssea, que é feita através de prolongamentos citoplasmáticos conduzidos por canalículos ao longo da matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Este sistema é crucial não apenas para a nutrição destas células, mas constitui um importante sistema de informação e vigilância do tecido ósseo – o sistema lacuno-canalicular. Após completarem a síntese da matriz, cerca de 5% dos osteoblastos ativados retornam à forma inativa revestindo a matriz calcificada; 30% tornam-se osteócitos, células ósseas maduras, que ocupam lacunas no interior da matriz calcificada; e 65% sofrem apoptose (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000). Considera-se a hipótese de que a transmissão de sinais mecânicos para os osteócitos via superfície celular pode ocorrer diretamente pela matriz do tecido devido ao fluxo de fluido induzido por carga mecânica, bem como indiretamente via estresse de pressão pelo sistema lacuno-canalicular. O aumento dos níveis de pressão pode causar a apoptose dos osteócitos devido ao surgimento de microfraturas que afetam a homeostase destas células (HAZENBERG et al., 2006).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas e sua função é reabsorver o tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A reabsorção óssea envolve dois processos: o recrutamento e a ativação dos osteoclastos (TAKAHASHI et al., 1999). Os osteoclastos diferenciam-se de células hematopoiéticas da linhagem mononuclear, que também podem ser encontradas circulando pelo sangue periférico (VÄÄNÄNEN, 2005). Conseqüentemente, enquanto os precursores de osteoblastos atingem o osso pela migração a partir dos tecidos vizinhos, os precursores dos osteoclastos chegam a partir da circulação (MANOLAGAS, 2000). No entanto, a formação dos osteoclastos limita-se ao tecido mineralizado, de forma que nunca aparecem na circulação (LERNER, 2000). Ainda não está claro o que determina o sítio de reabsorção no osso, mas existe a hipótese de que microfraturas, que precisam ser reparadas, sinalizariam o tecido-alvo. Na realidade, os osteócitos poderiam constantemente enviar sinais de “não-reabsorção” e com a morte de um osteócito, a interrupção do sinal indicaria o sítio de reabsorção (VÄÄNÄNEN, 2005). Ao chegarem ao local, os osteoclastos ligam-se à matriz mineralizada, reorganizam seu citoesqueleto, selando a zona de reabsorção e polarizando a membrana celular em dois domínios específicos: a borda em escova, voltada para a lacuna de reabsorção; e o domínio secretório, para o lado oposto da célula, por onde os produtos da reabsorção são secretados na circulação (SHEA e MILLER, 2005; VÄÄNÄNEN, 2005). Para a desmineralização da matriz, o ambiente

da lacuna de reabsorção é acidificado pelo osteoclasto, que possui bombas vacuolares de prótons e canais de cloreto (LERNER, 2000). A catépsina K é a principal enzima que degrada a matriz (VÄÄNÄNEN, 2005).

Células do estroma da medula óssea e osteoblastos têm um papel fundamental na osteoclastogênese, pois expressam citocinas e fatores de crescimento que iniciam e dão suporte à diferenciação osteoclástica, estimulando os osteoclastos por contato direto célula-célula, por intermédio de proteínas expressas na superfície de suas membranas. Além disso, os receptores para os principais hormônios osteotrópicos com capacidade de promover a reabsorção óssea encontram-se nos osteoblastos, que, quando estimulados, exercem uma atividade parácrina (LERNER, 2000).

Os ossos têm capacidade de reorganizar sua estrutura de acordo com a demanda funcional. Para isso, eles lançam mão da modelação e da remodelação óssea. O primeiro processo altera o formato do osso; o segundo envolve uma interação complexa de células que segue uma seqüência de ativação, reabsorção e formação óssea (HAZENBERG et al., 2006). A remodelação é um processo normal e altamente regulado. Ela envolve a ação coordenada de osteoblastos e osteoclastos, e assegura a integridade do esqueleto ao longo da vida. Neste processo, a reabsorção precede a formação óssea, e os osteoblastos ou seus precursores regulam a formação e a atividade dos osteoclastos (CARDA et al., 2005). Mediadores endócrinos (hormônios) e imunológicos (citocinas) estão envolvidos na regulação da remodelação (SHEA e MILLER, 2005).

Assim, o osso apresenta-se como um órgão heterogêneo, com quatro componentes responsivos a modulação fisiológica: osso cortical, osso medular, perióstio e endóstio (O'FLAHERTY, 1991).

2.6.2 O Sistema RANKL/RANK/OPG

A descoberta da presença do sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG tanto no sistema imune quanto no sistema ósseo mostrou que a relação entre esses dois sistemas é mais íntima do que se pensava. Além disso, várias citocinas, fatores estimuladores de colônia e moléculas sinalizadoras apresentam funções cruciais no tecido ósseo (GRCEVIC et al., 2001; BARON, 2004).

RANKL significa “Ligante do Receptor para a Ativação do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B)”. RANKL é uma citocina da superfamília do TNF e possui dois receptores, um funcional (RANK) e outro, a OPG (ou osteoprotegerina) que não apresenta função além de ligar-se ao RANKL para prevenir sua atividade, constituindo assim um mecanismo regulatório (GRCEVIC et al., 2001; WALSH e CHOI, 2003; FENG, 2005).

Este sistema de citocinas é um regulador da formação e ativação de osteoclastos, através do qual, muitos hormônios e citocinas produzem seu efeito de osteoabsorção. Dentro do sistema ósseo, RANKL é expresso na linhagem osteoblástica e em condrócitos que estão hipertrofiando, e exerce seu efeito ligando-se a seu receptor, RANK, expresso na linhagem osteoclástica. Esta ligação determina uma rápida diferenciação de precursores de osteoclastos e a uma ativação e resistência a apoptose dos osteoclastos maduros (GRCEVIC et al., 2001), efeito similar na interação RANKL/RANK em células T e células dendríticas (KARTSOGIANNIS et al., 1999). OPG é um receptor também produzido pelas células osteoblásticas e do estroma e que compete com RANK pela ligação ao RANKL. A ligação com OPG não desencadeia sinalização, portanto, sua ação é reguladora da atividade do RANKL (GRCEVIC et al., 2001; FENG, 2005). A produção de OPG também pode ser induzida em linfócitos B e células dendríticas (WALSH e CHOI, 2003).

A remodelação óssea é controlada por um balanço entre a ligação RANK/RANKL e a produção de OPG (GRCEVIC et al., 2001, BEZERRA et al., 2005). Vários hormônios, citocinas, fatores de crescimento ou drogas, de efeito local ou sistêmico, que têm propriedades osteotrópicas, têm a capacidade de alterar esse equilíbrio (GRCEVIC et al., 2001; FENG, 2005).

2.6.3 Osteoporose

A osteoporose é uma doença metabólica caracterizada por baixa densidade e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, aumentando a fragilidade do órgão e, conseqüentemente, o risco de fraturas (WHO, 1999). Tal caracterização é reflexo de um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, resultando em um osso com sua estrutura aparentemente normal, mas menos resistente a forças mecânicas. Patologicamente, esta condição chama-se osteopenia (THOMPSON, 2007). A tecnologia para mensuração da densidade mineral óssea (DMO – comumente utiliza-se a sigla em inglês BMD – *Bone Mineral Density*) trouxe características quantitativas ao conceito da osteoporose, o que permite um melhor diagnóstico e uma tomada de decisão mais eficaz pelo médico. Considera-se osteoporótico o indivíduo que apresentar DMO 2,5 desvios-padrão abaixo da média considerada normal ($T\text{-score} < -2,5$). $T\text{-score}$ entre -1 e -2,5 caracteriza clinicamente a osteopenia (FERRETTI et al., 2003). Histomorfometricamente, a doença é definida quando a perda óssea é maior que 11% (ALEXANDRE, 2005). A DMO é uma medida de diagnóstico mais sensível que histomorfometria (WEINSTEIN et al., 2004). Na ausência de tratamento, estudos *ex vivo* mostram excelente correlação entre DMO do fêmur proximal e a carga máxima obtida no teste de flexão do colo femoral e compressão vertebral (AMMANN, 2009). Apesar disso, *in vivo*, a avaliação clínica da força óssea é muito limitada. Mensurações de densidade e, talvez de marcadores de metabolismo ósseo, podem fornecer informação útil, porém incompleta sobre o risco de fraturas (DAVISON et al., 2009). A diminuição da estatura do indivíduo é altamente preditiva para fraturas vertebrais, o que nem sempre corresponde com os critérios clínicos de diagnóstico da osteoporose. No estudo conduzido por Xu et al. (2011), 30% dos pacientes teriam sido diagnosticados erroneamente se apenas a densidade mineral óssea tivesse sido considerada.

A osteoporose é classificada, segundo a causa, em primária (tipos I e II) e secundária. A osteoporose primária do tipo I, ou osteoporose idiopática pós-menopausa, está associada à deficiência de estrógeno. O tipo II, ou idiopática senil, está associado ao envelhecimento, fase em que ocorre deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do paratormônio (PTH) e diminuição de formação óssea. A osteoporose secundária é a perda óssea associada a processos inflamatórios, alterações endócrinas e uso de drogas (heparina, glicocorticóides, e outros) (GALI, 2001).

O número de fraturas decorrentes da osteoporose vem aumentando continuamente (WHO, 2003), porém, as informações sobre o impacto econômico e social da doença em países em desenvolvimento ainda são escassas (ROCHA e RIBEIRO, 2003; MORALES-TORRES e GUTIÉRREZ-UREÑA, 2004). Embora seja comum, a osteoporose é freqüentemente assintomática e não detectada até que ocorra uma fratura (REGINSTER e BURLET, 2006).

Embora a prevalência da doença seja alta, o diagnóstico nem sempre ocorre, particularmente em casos em que o paciente não apresenta evento traumático (CAPPER e FLANAGAN, 2005). A osteoporose é uma doença sistêmica, mas as fraturas debilitantes ocorrem principalmente no punho, vértebras e colo femoral (SHEA e MILLER, 2005).

Mulheres com fraturas vertebrais podem ter função física diminuída, dor nas costas, perda de altura e vida social prejudicada. Alguns estudos mostram que fraturas de quadris dentro de um grupo relativamente saudável de mulheres aumentam quase seis vezes o risco de morte e aproximadamente metade das mortes ocorre dentro de um ano. Além disso, os custos com fraturas osteoporóticas são altos e estão aumentando cada vez mais (REGINSTER e BURLET, 2006). Os homens têm menor prevalência de osteoporose que as mulheres por várias razões, dentre elas: os homens acumulam maior massa óssea; não são afetados por um evento similar à menopausa, ou seja, os níveis de testosterona declinam lentamente; a expectativa de vida para os homens é menor; e o número de homens submetidos à avaliação da densidade óssea é menor, podendo haver então uma conclusão incorreta sobre a prevalência da osteoporose em homens (LICATA, 2003).

A incidência da osteoporose em mulheres na pós-menopausa continua a aumentar com o envelhecimento progressivo das populações (REGINSTER e BURLET, 2006). Em 2005, nos Estados Unidos, mais de 10 milhões de indivíduos apresentavam osteoporose (SHEA e MILLER, 2005). Estima-se que em 2020, no Brasil, 11% da população terá mais de 60 anos (SIQUEIRA et al., 2005), mas as informações sobre o impacto econômico e social da osteoporose em países em desenvolvimento geralmente são escassas (ROCHA e RIBEIRO, 2003). Siqueira et al. (2005) realizaram um estudo na cidade de Pelotas – Rio Grande do Sul com o objetivo de estimar a prevalência de fraturas. Nesse estudo, foi verificado diagnóstico médico para osteoporose em 2,5% de todos os homens entrevistados e 12,2% das mulheres. Este diagnóstico apresentava correlação positiva com casos de fraturas nos 12 meses

anteriores à entrevista. Rocha e Ribeiro (2003) investigaram a incidência de fraturas de colo femoral em uma população residente em Sobral - Ceará, que representa uma área equatorial. Segundo estes autores, este tipo de estudo é importante para identificar fatores de risco ambientais e genéticos para melhor abordagem da prevenção e tratamento da osteoporose. Os resultados mostraram menor incidência de fraturas quando comparada a outras áreas do país. Os autores assumem que a população de Sobral é constituída principalmente de descendentes de europeus e indígenas, salientando que africanos não participam consideravelmente da formação desta população e especulam que a luz solar constante nesta região pode estar relacionada a melhores níveis de vitamina D3. Segundo Morales-Torres e Gutiérrez-Ureña (2004), na América Latina existem muitos dados disponíveis sobre a DMO de diversas populações. Entretanto, as prevalências de osteopenia e osteoporose não são bem conhecidas. Outro dado interessante verificado por estes autores é o fato de que a maior parte dos estudos mostra incidências de fratura de quadris mais baixas nas populações latino-americanas se comparadas com aquelas encontradas na população dos Estados Unidos, Canadá e Europa, mas que estes resultados podem ser devido a diferenças metodológicas, e frisam que outros estudos conduzidos nos Estados Unidos mostram menor incidência de fraturas de quadris entre mulheres mexicanas quando comparadas com caucasianas. Morales-Torres e Gutiérrez-Ureña concluíram que a América Latina apresenta grande diversidade geográfica e étnica, mas há uma falta de informação epidemiológica a respeito da osteoporose.

Os custos econômicos das fraturas osteoporóticas incluem os custos diretos, como com a hospitalização e pós-operatório, e os indiretos, como o prejuízo sobre tarefas diárias, incluindo dias não trabalhados (COMPSTON, 2010).

Nas mulheres, o principal fator responsável pela patogênese da osteoporose é a perda de estrógeno na menopausa (FAN et al., 2005). Nesta fase da vida, surgem alterações na remodelação óssea, um aumento do *turnover* com balanço negativo. A perda óssea é mais acentuada nos primeiros anos pós-menopausa (HERNANDEZ et al., 2003). O mecanismo fundamental pelo qual o estrógeno induz essa perda é o aumento do estímulo da formação e ativação de osteoclastos (CENCI et al., 2000), pois este hormônio é o principal regulador negativo da atividade osteoclástica. A ausência de estrógeno estimula a expressão de IL-1, IL-6 e TNF, que têm ação estimulante da reabsorção óssea e regula negativamente a expressão de IGF1, que tem ação estimuladora da formação óssea (FAN et al., 2005). O estrógeno modula a rede de

citocinas e sua ausência acaba por estimular inclusive a expressão de RANKL (RIGGS et al., 2002), cuja função será apresentada adiante.

Nos homens, ocorre um declínio lento da produção de andrógenos. Há uma diminuição gradual da massa óssea, que é linearmente relacionada à idade. Por isso, a osteoporose é mais comum em mulheres. Mas a osteoporose masculina não deixa de ser importante por causa disso. O impacto clínico da osteoporose é mais severo em homens que em mulheres. Hipogonadismo em homens é um forte fator de risco para osteoporose que contribui para a perda óssea em 20-30% dos homens idosos. Os andrógenos apenas não são suficientes para manter um status ósseo normal em homens saudáveis. O estradiol desempenha papel predominante na regulação da massa óssea via receptores α e β específicos localizados dentro dos osteoblastos (ALEXANDRE, 2005).

Com o avanço da idade, uma variedade de alterações endócrinas e metabólicas combina-se para enfraquecer o esqueleto. A produção de testosterona nos homens diminui assim como a produção de hormônio do crescimento em ambos os sexos e os músculos se deterioram. A absorção de cálcio torna-se ineficiente, o hiperparatireoidismo secundário aumenta e vários níveis de disfunção da vitamina D podem ser vistos (LICATA, 2003).

Glicocorticóides são muito utilizados no tratamento de doenças com componente inflamatório como a asma, a artrite reumatóide e a dermatite atópica, e também na manutenção de órgãos transplantados. No entanto, vários são os efeitos colaterais do uso dos glicocorticóides e, entre eles, a osteoporose destaca-se como o mais sério e debilitante. A osteoporose induzida por glicocorticóides pode ser ocasionada pela exposição crônica a concentrações excessivas de cortisol endógeno ou mesmo a doses farmacológicas. O efeito dos glicocorticóides no metabolismo ósseo depende da duração do tratamento, da dose e do tipo de corticoterapia, da idade, do sexo e do índice de massa corpórea, da susceptibilidade individual aos danos ósseos mediados pelos glicocorticóides e da doença concorrente para a qual o glicocorticóide é utilizado como tratamento. Tais fatores podem ter um efeito independente e aditivo na perda óssea. A perda óssea induzida por glicocorticóides tem caráter multifatorial e, como seus receptores são amplamente difundidos pelo organismo, eles podem exercer impacto no osso e no metabolismo do cálcio de várias maneiras. A característica cardinal da osteoporose induzida por glicocorticóides é a diminuição da formação óssea, visto que afetam os osteoblastos tanto na sua atividade proliferativa quanto metabólica, podendo exercer efeito inibitório direto de três formas: (1) inibindo a replicação de seus

precursores; (2) diminuindo a gênese de novos osteoblastos e; (3) induzindo sua apoptose. *In vitro*, os glicocorticóides são capazes de aumentar a expressão de RANKL e diminuir a de OPG. Adicionalmente, os glicocorticóides induzem perda óssea de forma indireta, por exemplo, ao diminuir a absorção de cálcio no intestino e a reabsorção deste mineral a partir do filtrado glomerular, induzindo um hiperparatireoidismo secundário. A osteoporose induzida por glicocorticóide é extensamente descrita na literatura científica (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000; REID, 2000; SAMBROOK e LANE, 2001; MCCLAUGHLIN et al., 2002; LANNA et al., 2003; MCILWAIN, 2003).

Os glicocorticóides podem ainda inibir o eixo HPG (PATSCHAND et al., 2001). Com o comprometimento da função gonadal, as mulheres apresentam amenorréia e os homens, infertilidade e impotência (ZIEGLER e KASPERK, 1998). Porém, segundo Weinstein et al. (2004), em modelos murinos, o hipogonadismo não ocorre ou contribui para a osteoporose induzida por glicocorticóides e os efeitos destas substâncias na perda óssea sobrepõem àqueles do hipogonadismo, ou seja, seus efeitos não são aditivos.

2.6.4 Modelos experimentais para o estudo da osteoporose

Os modelos animais comumente utilizados no estudo da osteoporose empregam principalmente ratos ou camundongos e os agentes promotores da perda óssea mimetizam a patogenia da osteoporose em humanos. Entretanto, os modelos não reproduzem fielmente a osteoporose humana, porém são poucas as diferenças (TURNER, 2001). Uma condição para a utilização dos modelos animais é a obtenção de informações sobre a qualidade e estrutura ósseas que não poderiam ser obtidas em pacientes de triagem clínica (THOMPSON et al., 1995). Uma grande vantagem na utilização de animais é a possibilidade de aplicação de testes biomecânicos, que verificam parâmetros como a resistência dos ossos à indução de fraturas (JÄMSÄ et al., 1998). É importante lembrar que as medidas de massa óssea, como a densidade mineral, são apenas parte dos fatores que determinam o risco de fratura (RUBIN et al., 1999). Embora existam divergências quanto à presença de remodelação haversiana em ratos (MARTIN et al., 2003), tanto a castração, representando a menopausa (BAGI et al.,

1997), quanto a administração de glicocorticóide (ORTOFT & OXLUND, 1996) são capazes de produzir perda de massa óssea, aumentando a fragilidade do órgão.

2.7 Referências bibliográficas

ADER R., Psychoneuroimmunology, In: SMELSER, N. J.; BALTES, P. B. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**. Pergamon: Oxford, 2001, p.12422-12428.

AHMED, R. G. Heat stress induced histopathology and pathophysiology of the Central Nervous System. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v.23, p.549-557, 2005.

ALEMANY, R.; PERONA, J. S.; SÁNCHEZ-DOMINGUEZ, J. M.; MONTERO, E.; CAÑIZARES, J.; BRESSANI, R.; ESCRIBÁ, P. V.; RUIZ-GUTIERREZ, V. G. Protein-coupled receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, p.964-975, 2007.

ALEXANDRE, C. Androgens and bone metabolism. **Joint Bone Spine**, v.72, p.202-206, 2005.

AMMANN, P. Bone strength and ultrastructure. **Osteoporosis Int**, v.20, p.1081-1083, 2009.

ANISIMOV, V. N.; BATURIN, D.; A.; POPOVICH, I. G.; ZABEZHINSKI, M. A.; MANTON, K. G.; SEMENCHENKO, A. V.; YASHIN, A. I. Effect of exposure to light-at-light on life span and spontaneous carcinogenesis in female CBA mice. **Int. J. Cancer**, v.111, p.475-479, 2004.

ANISMAN, H.; MATHESON, K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.525-546, 2005.

ARTIGA, A. I.; VIANA, J. B.; MALDONADO, C. R.; CHANDLER-LANEY, P. C.; OSWALD, K. D.; BOGGIANO, M. M. Body composition and endocrine status of long-term stress-induced binge-eating rats. **Physiology & Behavior**, v.91, p.424-431, 2007.

AUSTAD, S. N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.126, p.43-49, 2005.

BAGI, C. M.; WILKIE, D.; GEORGELOS, K.; WILLIAMS, D.; BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone**, v.21, n.3, p.261-267, 1997.

BAO, A.-M.; MEYNEN, G.; SWAAB, D. F. The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. **Brain Research Reviews**, v.57, p.531-553, 2008.

BARON, R. Arming the Osteoclast. **Nature Medicine**, v.10, n.5, p.458-460. 2004.

BERTONI-FREDDARI, C.; FATTORETTI, P.; CASOLI, T.; DI STEFANO, G.; GIORGETTI, B.; BALIETTI, M. Brain aging: The zinc connection. **Experimental Gerontology**, v.43, p.389-393, 2008.

BEZERRA, M. C.; CARVALHO, J. F.; PROKOPOWITSCH, A. S.; PEREIRA, R. M. R. RANK, RANKL and Osteoprotegerin in Arthritic Bone Loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v38, p161-170. 2005.

BRANN, D. W.; MAHESH, V. B. The aging reproductive neuroendocrine axis. **Steroids**, v.70, p.273-283, 2005.

BUCKINGHAM, J. C. Effects of Stress on Glucocorticoids. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol.2. Academic Press: San Diego, 2000, p.190-197.

CAPPER, C.; FLANAGAN, M. OPTIONS: Osteoporosis Prevention in UK Schools. **Journal of Orthopaedic Nursing**, v.9, p.39-42, 2005.

CARLSON, M. E.; SILVA, H. S.; CONBOY, I. M. Aging of signal transduction pathways, and pathology. **Experimental Cell Research**, v.314, p.1951-1961, 2008.

CENCI, S.; WEITZMANN, M. N.; ROGGIA, C.; NAMBA, N.; NOVACK, D.; WOODRING, J.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, p 1229-1237. 2000.

COMPSTON, J. Osteoporosis: Social and Economic Impact. **Radiol Clin N Am**, v.48, p.477-482, 2010.

CROMPTON, R.; CLIFTON, V. L.; BISITS, A. T.; READ, M. A.; SMITH, R. WRIGHT, I. M. R. Corticotropin-Releasing Hormone Causes Vasodilation in Human Skin via Mast Cell-Dependent Pathways. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.11, p.5427-5432, 2003.

DALLMAN, M. F., BHATNAGAR, S., VIAU, V. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol. 3. Academic Press, San Diego, 2000, p. 468–477.

DAVISON, K. S.; KENDLER, D. L.; AMMANN, P.; BAUER, D. C.; DEMPSTER, D. W.; DIAN, L.; HANLEY, D. A.; HARRIS, S. T.; MCCLUNG, M. R.; OLSZYNSKI, W. P.; YUEN, C. K. Assessing fracture risk and effects of osteoporosis drugs: Bone mineral density and beyond. **The American Journal of Medicine**, v.122, p.992-997, 2009.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOËL, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews**, v.19, p.269-301, 1998.

DODDS, C. Physiology of ageing. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v.7, n.12, p.456-458, 2006.

DOMÍNGUEZ-GERPE, L.; LEFKOVITS, I. Lymphocyte protein synthesis: evidence that murine T cells are more affected by stress than B cells. **Immunology Letters**, v.52, p.109-123, 1996.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v.10, n.9, p.359-368, 1999.

FAN, Y.; LIU, J.; WANG, S.; WANG, H.; SHI, F.; XIONG, L.; HE, W.; PENG, X. Functional Proteome of Bones in Rats with Osteoporosis Following Ovariectomy. **Life Sciences**, v. 76, p. 2893-2901. 2005.

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

FERDER, L. F.; INSERRA, F.; BASSO, N. Advances in our understanding of aging: Role of the renin-angiotensin system. **Current Opinion in Pharmacology**, v.2, n.2, p.189-194, 2002.

FERRETTI, J. L.; COINTRY, G. R.; CAPOZZA, R. F.; FROST, H. M. Bone Mass, Bone Strength, Muscle-Bone Interactions, Osteopenias and Osteoporosis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 269- 279. 2003.

FERRUCCI, L.; GIALLAURIA, F.; GURALNIK, J. M. Epidemiology of aging. **Radiologic Clinics of North America**, v.46, p.643-652, 2008.

GALI, J. C. Osteoporose. **Revista Acta Ortopedica Brasileira**, v. 9, p. 53-62. 2001.

GALLAGHER, M.; BIZON, J. L.; HOYT, E. C.; HELM, K. A.; LUND, P. K. Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment. **Experimental Gerontology**, v.38, p.71-77, 2003.

GAMEIRO, C. M.; ROMÃO, F.; CASTELO-BRANCO, C. Menopause and ageing: Changes in the immune system - A review. **Maturitas**, v.67, p.316-320, 2010.

GONG, Y.; CHAI, Y.; DING, J.-H.; SUN, X.-L.; HU, G. Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. **Neuroscience Letters**, v.488, p.76-80, 2011.

GONZALO-CALVO, D.; NEITZERT, K.; FERNÁNDEZ, M.; VEGA-NAREDO, I.; CABALLERO, B.; GARCÍA-MACÍA, M.; SUÁREZ, F. M.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J. SOLANO, J. J.; COTO-MONTES, A. Differential inflammatory response in aging and disease: TNF- α and IL-6 as possible biomarkers. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p.733-737, 2010.

GRČEVIĆ, D.; KATAVIĆ, V.; LUKIĆ, I. K.; KOVAČIĆ, N.; LORENZO, J. A.; MARUŠIĆ, A. Cellular and Molecular Interactions between Immune System and Bone. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 384-392. 2001.

HARVEY, J.; BERRY, J. A. Andropause in the aging male. **The Journal for Nurse Practitioners**, v.5, n.3, p.207-212, 2009.

HAZENBERG, J. G.; LEE, T. C.; TAYLOR, D. The Role of Osteocytes in Functional Bone adaptation. **BoneKey-Osteovision**, v. 3, p. 10-16, 2006.

HERNANDEZ, C. J.; BEAUPRÉ, G. S.; CARTER, D. R. A Theoretical Analysis of the changes in Basic Multicellular Unit Activity at Menopause. **Bone**, v.32, p.357- 363. 2003.

HERON, M.; HOYERT, D. L.; MURPHY, S. L.; XU, J.; KOCHANNEK, K. D.; TEJADA-VERA, B. Deaths: Final data for 2006. **National Vital Statistics Reports**, v.57, n.14, p.1-135, 2009.

IANCU, E. M.; SPEISER, D. E.; RUFER, N. Assessing ageing of individual T lymphocytes: Mission impossible? **Mechanisms of Ageing and Development**, v.129, p.67-78, 2008.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Observações sobre a evolução da mortalidade no Brasil: o passado, o presente e perspectivas. 2010. 56p.

Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade – 1980-2050 – Revisão 2008.

JÄMSÄ, T.; TUUKKANEN, J.; JALOVAARA, P. Femoral neck strength of mouse in two loading configurations: Method evaluation and fracture characteristics. **Journal of Biomechanics**, v.31, p.723-729, 1998.

JEYAPALAN, J. C.; SEDIVY, J. M. Cellular Senescence and organismal aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.129, p.467-474, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 412p.

KAJANTIE, E.; PHILLIPS, D. I. W. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.31, p.151-178, 2006.

KARTSOGIANNIS, V.; ZHOU, H.; HORWOOD, N. J.; THOMAS, R. J.; HARDS, D. K.; QUINN, J. M. W.; NIFORAS, P.; NG, K. W.; MARTIN, T. J.; GILLESPIE, M. T. Localization of RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) mRNA and Protein in Skeleton and Extraskelatal Tissues. **Bone**, n.25, p.525-534. 1999.

KLENEROVÁ, V.; JURČOVIČOVÁ, J. KAMINSKÝ, O.; ŠÍDA, P.; KREJÍ, I.; HLIŇÁK, Z.; HYNIE, S. Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. **Behavioural Brain Research**, v.142, p.143-149, 2003.

KUNG, H.-C.; HOYERT, D. L.; XU, J.; MURPHY, S. L. Deaths: Final data for 2005. **National Vital Statistics Reports**, v.56, n.10, p.1-121, 2008.

LANNA, C. M. M.; MONTENEGRO Jr; R. M.; PAULA, F. J. A. Fisiopatologia da Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 9-18. 2003.

LEBOFF, M. S.; GLOWACKI, J. Sex steroids, bone, and ageing. In: ROSEN, C. J.; GLOWACKI, J.; BILEZIKIAN, J, P. **The Aging Skeleton**. San Diego: Academic Press, 1999. p.159-174. doi: 10.1016/B978-012098655-2/50017-X.

LERNER, U. H. Osteoclast Formation and Resorption. **Matrix Biology**, v. 19, p. 107-120. 2000.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.939-946, 2005.

LICATA, A. Osteoporosis in Men: Suspect secondary Disease first. LICATA, A. Osteoporosis in Men: Suspect secondary Disease first. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.70, p.247-254. 2003.

LIMA-COSTA, M. F.; PEIXOTO, S. V.; GIATTI, L. Tendências da mortalidade entre idosos brasileiros (1980-2000). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, n.4, p.217-228, 2004.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde Pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.3, p.700-701, 2003.

LINTON, P.-J.; LUSTGARTEN, J.; THOMAN, M. T cell function in the aged: Lessons learned from animal models. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.6,p. 73-97, 2006.

LIPMAN, R. D. Pathobiology of ageing rodents: Inbred and hybrid models. **Experimental Gerontology**, v.32, n.1/2, p.215-228, 1997.

LLOYD-SHERLOCK, P. Population ageing in developed and developing regions: Implications for health policy. **Social Science & Medicine**, v.51, p. 887-895, 2000.

LOYOLA FILHO, A. I.; MATOS, D. L.; GIATTI, L.; AFRADIQUE, M. E.; PEIXOTO, S. V.; LIMA-COSTA, M. F. Causas de internações hospitalares entre idosos brasileiros no âmbito do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, n.4, p. 229-238, 2004.

MAFFUCCI, J. A.; GORE, A. C. Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. In: CONN, P. M. (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. New York: Academic Press, 2006, p.533-552.

MAGALHÃES, J. P. Species Selection in Comparative Studies of Aging and Antiaging Research. In: CONN, P. M. (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. New York: Academic Press, 2006, p.9-20

MAIER, S. F.; WATKINS, L.R. Cytokines for psychologist: Implication of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychological Review**, v.105, n.1, p.83-107, 1998.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, p.79–85. 2000.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, n. 21, p. 115-137. 2000.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology & Behavior**, v.90, p.29-35, 2007.

MARTIN, E. A.; RITMAN, E. L.; TURNER, R. T. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. **Bone**, v.32, p.261-267, 2003.

MASSON, P.; LAMBERT, S. M.; SCHLEGEL, P. N.; FISCH, H. Fertility and aging men: An introduction to the male biological clock. In: CONN, P. M. (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. New York: Academic Press, 2006, p.631-640.

MCEWEN, X. X. 2007. Definitions and Concepts of Stress. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol. 3. Academic Press, San Diego, 2000, p. 653.

MCILWAIN, H. H. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **Preventive Medicine**, v.36, p.243-249. 2003.

MCLAUGHLIN, F.; MACKINTOSH, .; HAYES, B. .P; MCLAREN, A.; UINGS, I. J.; SALMON, P.; HUMPHREYS, J.; MELDRUM, E.; FARROW, S. N. Glucocorticoid-Induced Osteopenia in the Mouse as Assessed by Histomorphometry, Microcomputed Tomography, and Biochemical Markers. **Bone**, v.30, p.924-930. 2002.

MEITES, J. Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. **Experimental Gerontology**, v.23, p.349-358, 1988.

MILLER, R. A. Principles of animal use for gerontological research. In: CONN, P. M. (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. New York: Academic Press, 2006, p.21-31.

MILNE, E. M. G. When does human ageing begin? **Mechanisms of Ageing and Development**, v.127, p.290-297, 2006.

MINIÑO, A. M.; HERON, M. P.; MURPHY, S. L.; KOCHANNEK, K. D. Deaths: Final data for 2004. **National Vital Statistics Reports**, v.55, n.19, p.1-120, 2007.

MØLLER, P.; LØHR, M.; FOLKMANN, J. K.; MIKKELSEN, L.; LOFT, S. Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. **Free Radical Biology & Medicine**, v.48, p.1275-1285, 2010.

MORALES-TORRES, J.; GUTIÉRREZ-UREÑA, S. The Burden of Osteoporosis in Latin America. **Osteoporosis International**, v. 15, p. 625-632. 2004.

MUELLER, B. R.; BALE, T. L. Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. **Physiology & Behavior**, v.88, p.605-614, 2006.

NEAL-PERRY, G.; NEJAT, E.; DICKEN, C. The neuroendocrine physiology of female reproductive aging: An update. **Maturitas**, v.67, p.34-38, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry.4th, ed. New York: W. H. Freeman., 2004. p.930.

NG, K. W.; ROMAS, E.; DONNAN, L.; FINDLAY, D. M. Bone Biology. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.11, p.1-22. 1997.

O'FLAHERTY, E. J.; Physiologically based models for bone-seeking elements. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.111, p.299-312, 1991.

ORTOFT, G.; OXLUND, H. Qualitative alterations of cortical bone in female rats after long-term administration of growth hormone and glucocorticoid. **Bone**, v.18, n.6, p.581-590, 1996.

OTTENWELLER, J. E. Animal Models (Nonprimate) for human stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, 2000, v.2, p.190-194.

PACAK, K.; McCARTY, R. Acute Stress response: Experimental. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, 2000, v.2, p.7-14.

PARDON, M.-C. Stress and ageing interactions: A paradox in the context of shared etiological and physiopathological process. **Brain Research Reviews**, v.54, p.251-273, 2007.

PATSCHAND, D; LODDENKEMPER, K; BUTTGEREIT, F. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Bone**, v. 29, p. 498-505. 2001.

PEIXOTO, S. V.; GIATTI, L.; AFRADIQUE, M. E.; LIMA-COSTA, M. F. Custo das internações hospitalares entre idosos brasileiros no âmbito do sistema Único de saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, n.4, p.239-246, 2004.

PRUETT, S. B. Stress and the immune system. **Pathophysiology**, v.9, p.133-153, 2003.

REGINSTER, J.-Y.; BURLET, N. Osteoporosis: A Still Increasing Prevalence. **Bone**, v.38, p.S4-S9, 2006.

REID, I. R.; Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.14, p.279-298. 2000.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex Steroids and the Construction and conservation of the Adult Skeleton. **Endocrine Reviews**, v.23, n.3, p. 279-302. 2002.

RIVIER, C. Gender, sex steroids, corticotropin-releasing factor, nitric oxide, and the HPA response to stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.64, n.4, p.739-751, 1999.

ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, A. R. Low Incidence of Hip Fractures in an Equatorial Area. **Osteoporosis International**, v. 14, p. 496-499. 2003.

ROHLEDER, N.; KUDIENKA, B. M.; HELLHAMMER, D. H.; WOLF, J. M.; KIRSCHBAUM, C. Age and sex steroid-related changes in glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production after psychosocial stress. **Journal of Neuroimmunology**, v.126, p.69-77, 2002.

ROSMOND, R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1-10, 2005.

RUBIN, J., RUBIN, H., RUBIN, C. Constraints of experimental paradigms used to model the aging skeleton. In: ROSEN, C.; GLOWACKI, J.; BILIZEKIAN, J. **The Aging Skeleton**. Acad. Press, 1999, Ch.4; p.27-36.

SAMBROOK, P; LANE, N E. Corticosteroid Osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.15, p.401-413. 2001.

SANDI, C.; TOUYAROT, K. Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates. **Neurobiology of Aging**, v.27, p.128-140, 2006.

SERLACHIUS, A.; HAMER, M.; WARDLE, J. Stress and weight change in university students in the United Kingdom. **Physiology & Behavior**, v.92, p.548-553, 2007.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal Function and Structure: Implications for Tissue-Target Therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.945-957. 2005.

SINCLAIR, D. A.; OBERDOERFFER, P. The ageing epigenome: Damaged beyond repair? **Ageing Research Reviews**, v.8, p.189-198, 2009.

SIQUEIRA, F. V.; FACCHINI, L. A.; HALLAL, P. C. The Burden of Fractures in Brazil: A Population-Based Study. **Bone**, v.37, p.261-266. 2005.

SPROTT, R. L.; AUSTAD, S. N. Historical development of animal models of aging. In: CONN PM, ed. **Handbook of Models for Human Aging**. Burlington: Elsevier Academic Press, 2006; 1-8.

STEPTOE, A. Stress effects, overview. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol.3. Academic Press: San Diego, 2000, p.599-600.

STRAUB, R. H.; CUTOLO, M.; ZIETZ, B.; SCHÖLMERICH, J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, p.1591-1611, 2001.

STROUD, L. R.; SALOVEY, P.; EPEL, E. S. Sex differences in stress responses: Social rejection versus achievement stress. **Biol Psychiatry**, v.52, p.318-327, 2002.

SUGAMA, S.; TAKENOUCI, T.; FUJITA, M.; KITANI, H.; HASHIMOTO, M. Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1 β expression astroglial cells in rat brain. **Journal of Neuroimmunology**, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.11.002, 2010.

SZELÉNYI, Z.; PALKÓ, Á.; SZÉKELY, M. Heat-induced acute hyperthermia results in a reversible depression of cold defence in the rat (*Rattus norvegicus*). **J. Therm. Biol.**, v.21, n.3, p.163-170, 1996.

TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; SUDA, T. A. A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 449-455. 1999.

TAMASHIRO, K. L. K.; HEGEMAN, M. A.; NGUYEN, M. M. N.; MELHORN, S. J.; MA, L. Y.; WOODS, S. C.; SAKAI, R. R. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. **Physiology & Behavior**, v.91, p.440-448, 2007.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M. KE, H. Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.17, n.4, 1997.

THOMPSON, K. Bones and joints. In: MAXIE M.G. (Ed.), **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Vol.1. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 1-184, 2007.

TORRES, S. J.; NOWSON, C. A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v.23, p.887-894, 2007.

TURNER, A. S. Animal models os osteoporosis - Necessity and limitations. **European Cells and Materials**, v.1, p.66-81, 2001.

VÄÄNÄNEN, K. Mechanism of Osteoclast Mediated Bone Resorption - Rationale for the Design of New Therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 959-971. 2005.

VAN DE VEN, M.; ANDRESSOO, J.-O.; HOLCOMB, V. B.; HASTY, P.; SUH, Y.; VAN STEEG, H.; GARINIS, G. A.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; MITCHELL, J. R. Extended longevity mechanisms in short-lived progeroid mice: Identification of a preservative stress response associated with successful aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.128, p.58-63, 2007.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE Axis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, p.251-263. 2003.

WARNER, H. R. Is cell death and replacement a factor in ageing? **Mechanisms of Ageing and Development**, v.128, p.13-16, 2007.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and Osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v. 108, p. 153-164. 2000.

WEINSTEIN, R. S.; JIA, D.; POWERS, C. C.; STEWART, S. A.; JILKA, R. L.; PARFITT, A. M.; MANOLAGAS, S. C. The Skeletal Effects of Glucocorticoid Excess Override Those of Orchidectomy in Mice. **Endocrinology**, v. 145, p. 1980-1987. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO/58. Osteoporosis: Both health organization and individuals must act now to avoid an impending epidemic. Information Office, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis. WHO Technical Report Series, v. 921, 193p. 2003.

XU, J.; KOCHANNEK, K. D.; MURPHY, S. L.; TEJADA-VERA, B. Deaths: Final data for 2007. **National Vital Statistics Reports**, v.58, n.19, p.1-135, 2010.

XU, W. W.; PERERA, S.; MEDICH, D.; FIORITO, G.; WAGNER, J.; BERGER, L. K.; GREENSPAN, S. L. Height loss, vertebral fractures, and the misclassification of osteoporosis. **Bone**, v.48, p.307-311, 2011.

ZIEGLER, R; KASPERK, C. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Prevention and Treatment. **Steroids**, v.63, p.344-348. 1998.

3 CAPÍTULO II

METODOLOGIA COMPLETA

3.1 Resumo

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*), sendo dez machos e dez fêmeas com cinco meses de idade, e dez machos e dez fêmeas entre 22 e 24 meses de idade. Os animais foram distribuídos em grupos de cinco indivíduos, segundo o sexo, a idade e o tratamento. Metade dos animais foi submetida a um protocolo de estresse moderado crônico, que incluía os seguintes estressores e tempos de aplicação: frio (2h), calor (2h), isolamento (24h), inclinação da gaiola (3h), privação de água (12h), privação de comida (12h), imobilização (20min) e iluminação noturna. Cada estressor foi aplicado quatro vezes em um total de 28 dias. Após este período, os animais foram pesados, eutanasiados e tiveram ossos e sangue coletados. Fêmur direito, tíbia direita e vértebra L4 foram analisados por densitometria, obtendo-se o conteúdo mineral ósseo, a área do osso e a densidade mineral óssea. O fêmur esquerdo foi submetido a dois testes biomecânicos: flexão da cabeça e flexão da diáfise. Foram avaliadas a força máxima, a rigidez e a tenacidade aos testes. Fêmur direito e vértebra L5 foram também analisados histomorfometricamente para obtenção do volume trabecular ósseo do corpo vertebral e da cabeça femoral, bem como medidas totais, do osso cortical e da cavidade medular da seção transversal da diáfise do fêmur. Do sangue foram avaliados o perfil das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α ; bem como as concentrações de estradiol e testosterona. Os dados foram divididos e apresentados em quatro capítulos desta tese, sendo submetidos à análise estatística mais apropriada a cada caso.

Palavras-chave: ratos, estresse, envelhecimento, densitometria, biomecânica, histomorfometria, hormônios sexuais, citocinas, metodologia.

3.2 Abstract

METHODOLOGY

A total of 40 rats (*Rattus norvegicus*), 10 males and 10 females 5 months old, and 10 males and 10 females between 22 and 24 months of age, were employed to reach the aim of this work. The animals were separated by sex, age and treatment into groups of 5 individuals. Half of them were subjected to a protocol of chronic mild stress, which included the following stressors: cold (2h), heat (2h), isolation (24h), tilt the cage (3h), water deprivation (12h), food deprivation (12h), immobilization (20min) and night light. Each stressor was applied four times during 28 days. After this period, rats were weighed, euthanized, and blood and bones were collected. Right femur, right tibia and L4 vertebrae were analyzed by densitometry, providing bone mineral content, bone area and bone mineral density. Left femur was subjected to biomechanical bending on its head and diaphysis, providing maximum strength, stiffness and toughness. Right femur and L5 vertebra were also submitted to histomorphometric analysis to obtain means for bone trabecular volume in femoral head and vertebral body, and measures of cortical bone and marrow cavity in femoral diaphysis cross-section. IL-1 β , IL-6 and TNF- α profiles and estradiol and testosterone concentrations were assessed in blood samples by ELISA. Data presented are distributed throughout four chapters, so they were subjected to the most appropriate statistical analysis in each case.

Keywords: rats, stress, aging, bone densitometry, biomechanics, histomorphometry, sex hormones, cytokines, methodology.

3.3 Introdução

Este capítulo apresenta os procedimentos completos utilizados no presente trabalho com o intuito de auxiliar o desenvolvimento de projetos futuros. A partir da observação de que a densidade mineral óssea (DMO) apresenta-se diminuída em pacientes com depressão (CIZZA et al., 2009) e da confirmação de que o modelo de estresse moderado crônico – modelo animal reconhecido para o estudo da depressão (WILLNER, 1997) – é capaz de induzir a perda de massa óssea em camundongos (YIRMIYA et AL., 2006), destacou-se a importância do desenvolvimento de estudos que investiguem a influência do estresse no metabolismo ósseo.

Este trabalho de tese é parte de um projeto mais extenso que deu origem também à tese intitulada “Efeitos do Estresse Crônico sobre o Timo e o Hipocampo de Ratos Jovens e Senis Submetidos a Desafio Imunológico e Tratamento com Hormônio do Crescimento (Modelo Experimental)”, defendida por Anna Paula Baptista Ribeiro Ferreira, sob orientação da Professora Marlene Isabel Vargas Vitoria, neste mesmo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa (Ficha catalográfica ainda em confecção). O material coletado a partir desta metodologia também originou dois trabalhos de iniciação científica pelo PIBIC/CNPq, conduzidos pelo aluno de graduação Leonardo Dourado da Costa. O primeiro foi apresentado com o título de “Histomorfometria do ílio de ratas jovens e senis submetidas a estresse moderado crônico” (COSTA et al., 2010), enquanto o segundo ainda se encontra em andamento.

3.4 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos adotados neste trabalho estão 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 aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, pelo processo 52/2009

(Anexo). As normas adotadas pela comissão podem ser encontradas no endereço: <http://www.posvet.ufv.br>.

3.5 Animais

Para o presente trabalho, foram utilizados 40 ratos adultos (*Rattus norvegicus*), todos provenientes do Biotério Central da UFV, sendo 10 machos e 10 fêmeas de 5 meses de idade, aqui denominados jovens, e 10 machos e 10 fêmeas entre 10 e 12 meses de idade, que foram mantidos em sala climatizada recebendo água e ração à vontade até que atingissem a idade desejada para este estudo. Estes animais faziam parte do grupo de matrizes de reprodução e seriam descartados com cerca de 12 meses de idade, quando foram adquiridos para o presente trabalho. Ao início do experimento, os animais tinham entre 22 e 24 meses, e são referidos como senis ou idosos. Os ratos foram distribuídos em grupos de cinco indivíduos, segundo o sexo, a idade e o tratamento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Divisão dos animais em grupos, segundo o sexo, a idade e o tratamento.

Grupo	Sexo	Idade	Tratamento	n
1	Macho	Jovem	Controle	5
2	Macho	Senil	Controle	5
3	Fêmea	Jovem	Controle	5
4	Fêmea	Senil	Controle	5
5	Macho	Jovem	Estresse	5
6	Macho	Senil	Estresse	5
7	Fêmea	Jovem	Estresse	5
8	Fêmea	Senil	Estresse	5

O termo ‘tratamento’ foi utilizado para agrupar a utilização ou não do protocolo de estresse crônico. Na tabela, os animais denominados ‘controle’ na coluna ‘tratamento’ não receberam qualquer tipo de tratamento, enquanto os animais denominados ‘estresse’ foram submetidos ao protocolo descrito adiante. Os grupos apresentarão denominações distintas nos próximos capítulos desta tese, mas cada caso será detalhado na ocasião pertinente. Cada grupo contava inicialmente com cinco

animais. Um macho e uma fêmea vieram a óbito antes do início da aplicação do protocolo de estresse; assim, os grupos controle de senis eram compostos por quatro indivíduos. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas (41x34x16cm), forradas com maravalha. A cada três dias, as gaiolas e as garrafas de água eram lavadas, higienizadas com hipoclorito de sódio, e a maravalha substituída.

O experimento foi conduzido em uma sala preparada no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV), com ciclo de luz de 12h e temperatura monitorada. Os animais receberam ração comercial e água à vontade durante todo o experimento, com exceção dos animais submetidos ao protocolo de estresse, nas situações específicas descritas posteriormente. Todos os animais foram pesados no primeiro dia do experimento.

3.6 Estresse moderado crônico

O protocolo de estresse moderado crônico (EMC) utilizado neste experimento foi delineado a partir de diversas fontes (GAMARO *et al.*, 2003; BEKRIS *et al.*, 2005; DALLA *et al.*, 2005; BAKER *et al.*, 2006; JAYATISSA *et al.*, 2008; DETANICO *et al.*, 2009; LUCCA *et al.*, 2009), sendo adaptando para a idade dos animais e para a infra-estrutura disponível. Foram selecionados oito fatores estressores, aplicados por 28 dias, conforme o cronograma apresentado na Tabela 3.2. A aplicação de cada estressor é detalhada a seguir.

Tabela 3.2 Cronograma de aplicação dos estressores.

Dias	Estressor	Hora Início	Duração
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	

No momento da aplicação do frio, os animais eram transferidos para uma gaiola plástica, sem maravalha, colocada dentro de uma bandeja com gelo. O sistema foi protegido por uma caixa de papelão grande, aberta na parte superior. O sensor externo do termômetro era posicionado dentro da gaiola, próximo ao fundo, sem encostar. A temperatura foi monitorada a cada cinco minutos e mais gelo era acrescentado toda vez que ela ultrapassasse 12°C dentro da gaiola. Neste sistema, a temperatura variava entre 10 e 12°C, raramente caindo para menos de 8°C. Os animais eram mantidos nestas condições por duas horas, começando sempre às 14h no dia em que este estressor era aplicado. Às 16h, eram transferidos para uma gaiola limpa com maravalha nova.

Para a aplicação do calor, a gaiola dos animais era colocada dentro de uma caixa de papelão e um aquecedor elétrico de ar (Mallory, Modelo Saara, 1500W) era posicionado em direção à gaiola. O sensor do termômetro foi colocado ao fundo da caixa e a temperatura monitorada a cada cinco minutos, sendo sempre mantida entre 38 e 40°C. O estressor era aplicado durante duas horas, com início às 16h.

Os animais quando submetidos ao isolamento eram transferidos para gaiolas aramadas individuais, onde permaneciam por 24 horas, das 7h da manhã do dia indicado no cronograma até as 7h da manhã do dia seguinte. As gaiolas ficavam posicionadas lado a lado, porém foram inseridas divisórias entre elas, impedindo o contato visual entre os animais, mas não o auditivo e olfativo.

Para a inclinação, as gaiolas dos animais eram mantidas apoiadas na parede, de forma que o fundo da gaiola descrevesse um ângulo de 45° com o plano horizontal. A aplicação deste estressor iniciava-se às 13h e era mantida por três horas.

Quando submetidos à privação de água, os animais tinham a garrafa retirada da gaiola às 7h da manhã e retornada às 19h. Imediatamente a ração era recolhida e fornecida novamente apenas às 7h da manhã do dia seguinte.

Para a imobilização, foram confeccionadas peças de pano, em que os animais eram envolvidos e presos por fita com velcro. Uma tela permitia a respiração do animal. Permaneciam imobilizados por 20 minutos, à partir das 7h da manhã.

Às 19h, as gaiolas eram transferidas para outra sala, onde a luz permanecia acesa durante toda a noite. Às 7h da manhã do dia seguinte, os animais retornavam à sala principal do experimento.

3.7 Coleta e Análise do Material

No 29º dia do experimento, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação em guilhotina. O sangue foi imediatamente coletado, com a ajuda de um funil, em tubos de vidro contendo anticoagulante. Em seguida, o animal foi necropsiado e os ossos coletados. O fêmur esquerdo e a quarta vértebra lombar (L4) foram dissecados, depositados em sacos plásticos (4x23cm) contendo tampão fosfato-salino (PBS) tamponado pH 7,4 e congelados em freezer (-20°C). Fêmur direito, tíbia direita e vértebra L5, após dissecação foram colocados em frascos de plástico contendo solução neutra tamponada de paraformaldeído a 4%. Após 48 horas de fixação, o formol foi substituído por álcool 70%.

3.8 Densitometria Óssea

A tíbia e o fêmur fixados, e a vértebra congelada foram submetidos à análise densitométrica na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba-SP. Foi utilizado um densitômetro modelo DPX-A (Figura 3.1), com software específico para pequenos animais para determinação do conteúdo mineral ósseo (CMO), dado em gramas; da área, em cm²; e da densidade mineral óssea (DMO), em g/cm². A relação entre esses parâmetros é expressa pela fórmula:

$$DMO = \frac{CMO (g)}{Área (cm^2)}$$

As vértebras tiveram todos os processos removidos com alicate, para que fosse feita apenas a análise do corpo vertebral. Os ossos foram posicionados sempre da mesma forma dentro de um recipiente com 2cm de altura de água para fazer correspondência a tecido mole (Figura 3.2). O fêmur e a tíbia do mesmo animal foram escaneados juntos (Figura 3.3). Para a análise dos corpos vertebrais, todas as amostras do mesmo grupo foram posicionadas lado a lado (Figura 3.4). Para efeito de

padronização, o programa foi configurado para sexo masculino, altura de 170cm e peso de 70kg. A aquisição da imagem foi feita no modo lento. Após o escaneamento, os ossos foram delimitados manualmente para a leitura do programa e os resultados anotados. Os fêmures utilizados nesta análise foram retornados ao álcool 70% e encaminhados para a histomorfometria.



Figura 3.1 Densitômetro modelo DPX-A

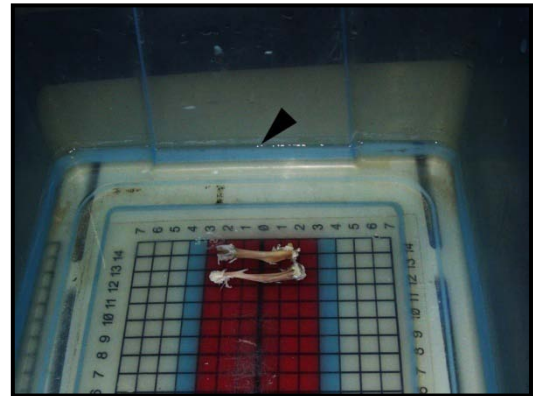


Figura 3.2 Recipiente plástico em que eram posicionadas as amostras a serem analisadas na densitometria. A cabeça de seta indica o nível de água (2cm).

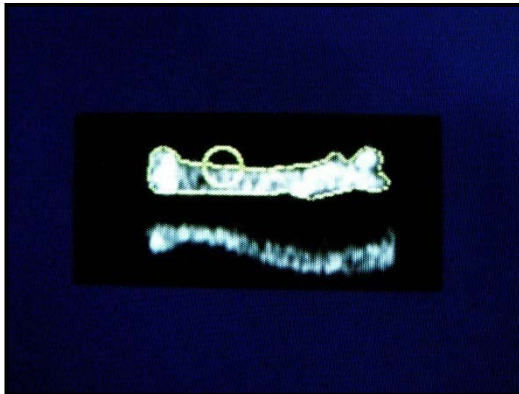


Figura 3.3 Imagem capturada pelo densitômetro do fêmur e da tíbia do mesmo animal.

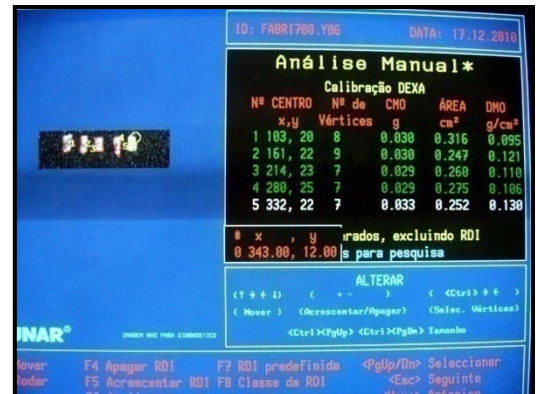


Figura 3.4 Tela do programa associado ao densitômetro durante a análise dos corpos vertebrais.

3.9 Histomorfometria

Fêmures direitos e vértebras L5 foram descalcificados em solução de citrato de sódio e ácido fórmico, que foi substituída após uma semana. Ao final de duas semanas, os ossos encontravam-se suficientemente descalcificados para o processamento histológico. O material foi lavado em água corrente por 24 horas e em solução de sulfato de sódio a 5% pelo mesmo tempo. Em seguida, os ossos foram cortados em fragmentos menores para um processamento mais eficiente. Dos fêmures, foram retirados dois fragmentos transversais da diáfise. As epífises foram seccionadas longitudinalmente (Figura 3.5) e as vértebras cortadas em seu eixo sagital mediano (Figura 3.6). Uma amostra de cada corte foi processada; o material não utilizado foi guardado em álcool 70% para possível contraprova ou novas análises.

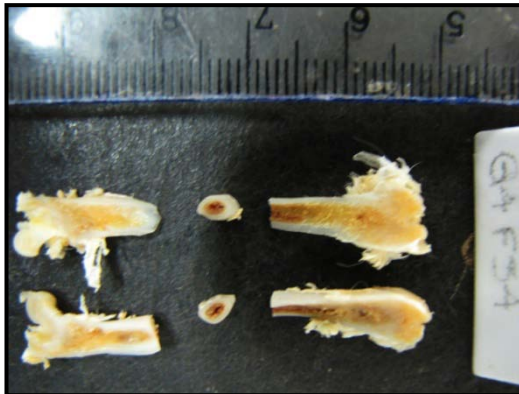


Figura 3.5 Seções macroscópicas realizadas nos fêmures após a descalcificação para o processamento histológico.



Figura 3.6 Seção macroscópica realizada nas vértebras após a descalcificação para o processamento histológico.

O material foi processado em aparelho histotécnico para tecidos (Leica TP1020), passando por alcoóis 70, 80, 90, 100 e 100%, por duas soluções de xilol e dois banhos de parafina. Em todas as soluções, o material foi mantido por 60min. Em seguida, foram montados os blocos de parafina, cada um contendo um fragmento, em cassetes plásticos, utilizando o sistema de inclusão histológica (Leica EG1150H). Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo de rotação (Leica RM2245) com espessura de 4µm. Foram coletados três cortes de cada amostra, tendo cada um pelo menos 20µm de distância do outro.

Após permanecerem em estufa a 56-60°C durante uma 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 ótico (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 foi avaliado no corpo das vértebras e na cabeça do fêmur, pelo método de planimetria por contagem de pontos. No primeiro caso, foram realizadas fotomicrografias em aumento de 100x tanto na porção cranial quanto na caudal do corpo da vértebra, para os três cortes realizados, totalizando seis imagens para cada animal (Figura 3.7). O campo de observação para análise dos fêmures foi determinado como um campo médio ao longo e abaixo da linha de crescimento, de forma que ela não estivesse presente na imagem adquirida no aumento de 100X, abrangendo apenas osso trabecular (Figura 3.8). O volume trabecular da cabeça do fêmur de cada animal foi calculado como a média das três observações.

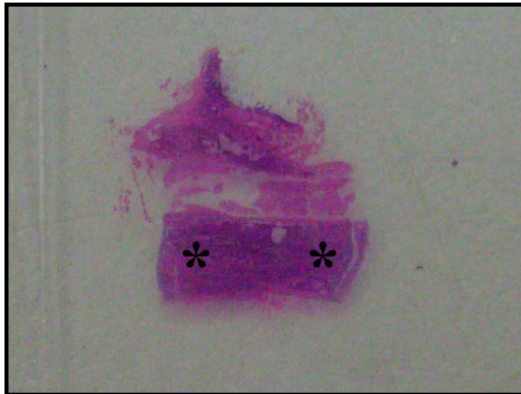


Figura 3.7 Foto macroscópica do corte histológico de uma vértebra. Os asteriscos indicam os sítios avaliados na análise histomorfométrica.

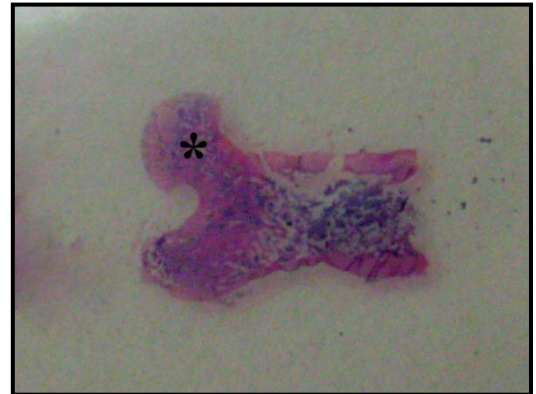


Figura 3.8 Foto macroscópica do corte histológico de um fêmur. O asterisco indica o sítio avaliado na análise histomorfométrica.

Sobre cada imagem foi sobreposta uma grade de 12 linhas e 16 colunas, totalizando 192 pontos de interseção (Figura 3.9). Os pontos coincidentes com osso foram contabilizados e o volume trabecular ósseo foi dado pela fórmula a seguir, em porcentagem:

$$\text{Volume Trabecular Ósseo (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de pontos sobre osso}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de pontos}} \times 100$$

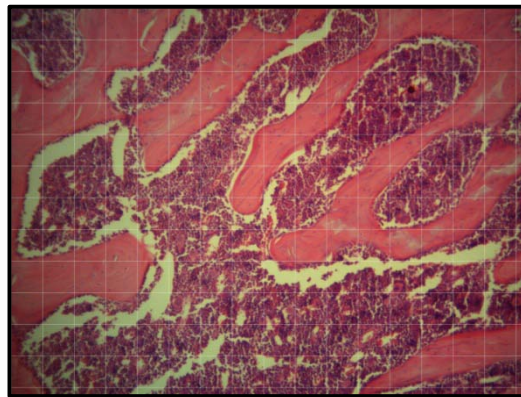


Figura 3.9 Fotomicrografia da região de osso trabecular da cabeça de um fêmur, com a sobreposição de uma grade composta por 192 interseções. As 12 linhas e 16 colunas interceptam-se a cada 8µm.

O corte transversal da diáfise do fêmur foi utilizado para a obtenção dos parâmetros: espessura do osso cortical, em µm; área do osso cortical, em µm²; diâmetro do canal medular, em µm; área do canal medular, em µm²; perímetro do canal medular, em µm; diâmetro total, em µm; área total, em µm²; e perímetro total, em µm. Os parâmetros histomorfométricos avaliados neste trabalho foram descritos segundo a padronização de Parfitt (1980), sumarizada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Medidas histomorfométricas utilizadas no presente trabalho e sua correspondência segundo a padronização sugerida por Parfitt (1987).

Medida	Abrev.	Significado	Unidade
Área Total	B.Ar	<i>Bone Area</i>	μm^2
Área da Cavidade Medular	Ma.Ar	<i>Marrow Area</i>	μm^2
Área do Osso Cortical	Ct.Ar	<i>Cortical Area</i>	μm^2
Perímetro Ósseo	B.Pm	<i>Bone Perimeter</i>	μm
Perímetro da Cavidade Medular	Ma.Pm	<i>Marrow Perimeter</i>	μm
Diâmetro Total	B.Dm	<i>Bone Diameter</i>	μm
Diâmetro da Cavidade Medular	Ma.Dm	<i>Marrow Diameter</i>	μm
Espessura do Osso Cortical	Ct.Wi	<i>Cortical Width</i>	μm
Volume Trabecular Ósseo	BV/TV	<i>Bone Volume / Total Volume</i>	%

As lâminas foram analisadas em lupa estereoscópica (WILD HEERBRUGG, Modelo M5A) no aumento de 25X e fotografadas em câmera digital comum (Samsung S630) acoplada à lente objetiva, que por sua vez contém uma grade de referência, que orientou a análise do material após a calibração do software para o mesmo aumento (Figura 3.10). Ct.Wi, Ma.Dm e B.Dm foram dados como a média de oito mensurações em direções diferentes. Apesar de o B.Dm ser o resultado da soma dos outros dois parâmetros, as mensurações foram feitas independentemente para melhor ajuste dos dados, evitando-se repetição de possíveis erros. Ct.Ar foi calculada subtraindo-se a área do canal medular da área total da secção transversal da diáfise do fêmur. A Figura 3.11 mostra a representação esquemática de algumas medidas apresentadas.

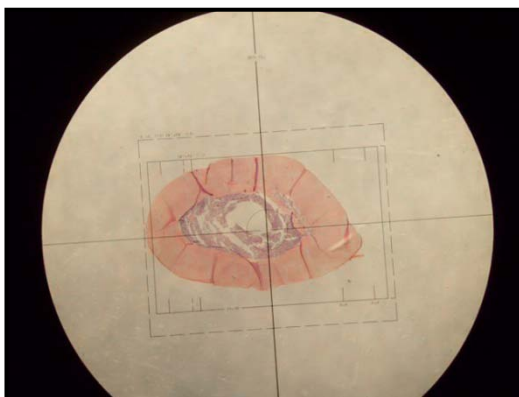


Figura 3.10 Fotografia obtida da observação do corte histológico em lupa, no aumento de 25x.

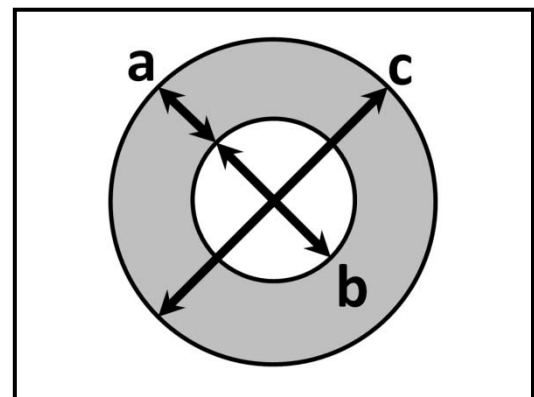


Figura 3.11 Esquema de análise do corte histológico representando o corte transversal da diáfise do fêmur, em que a, b e c correspondem respectivamente às medidas de espessura do osso cortical, diâmetro do canal medular e diâmetro total

Dos dados obtidos, duas relações foram calculadas para expressar a relação entre osso cortical e canal medular, ao dividir-se a espessura do osso cortical pelo diâmetro da cavidade medular: $Ct.Wi/Ma.Dm$ e $Ct.Ar/Ma.Ar$.

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 Vetores no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária, na UFV (LBCHV/BIOAGRO-UFV).

3.10 Ensaio Biomecânico

Os fêmures congelados foram encaminhados para a Faculdade de Odontologia da UNESP/Araçatuba – SP, onde foram realizados os testes biomecânicos, em uma máquina universal de ensaio mecânico (EMIC®, DL3000) do Departamento de Materiais Dentários, com velocidade de carga aplicada de 5mm/min e célula de carga de 2000N. Dois testes foram realizados: flexão da cabeça do fêmur (Figura 3.12A) e flexão em três pontos na diáfise do fêmur (Figura 3.12B). No primeiro, o osso foi fixado verticalmente em um suporte por meio de parafusos, com a diáfise voltada para cima e a carga foi aplicada sobre a cabeça do fêmur. No segundo teste, o osso foi posicionado horizontalmente entre dois suportes distantes 20mm entre si e a força foi aplicada verticalmente no centro do sistema.

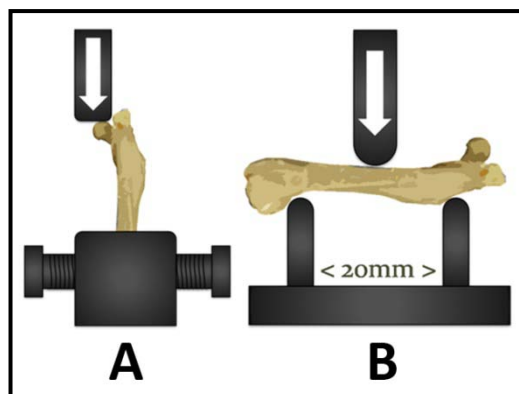


Figura 3.12 Desenho esquemático do teste biomecânico. (A) Flexão da cabeça do fêmur e (B) Flexão da diáfise do fêmur em três pontos, com distância de 20mm entre os suportes.

O programa computacional acoplado ao aparelho fornece, em um documento de texto, a deformação (mm) e a força aplicada (N) em diversos tempos ao longo do ensaio. Esses dados foram transferidos para uma planilha no Microsoft Office Excel 2007®, onde foi montada a curva Força x Deslocamento para cada amostra. Dentro da curva, foi selecionada uma área para o cálculo da rigidez. Para isso, a área escolhida deveria, dentro do possível, ser a mais inicial, compreender o maior número de pontos e apresentar regressão linear mais confiável. O valor de R^2 para todas as áreas selecionadas foi maior que 0,998. O valor de a da regressão linear na forma $y=ax+b$ representa a inclinação da curva, ou seja, a rigidez do osso. Ainda com os valores obtidos no ensaio biomecânico, a energia absorvida pelo osso até a sua fratura é representada pela área do gráfico, que foi então obtida por cálculo integral, somando-se as áreas dos retângulos formados entre cada ponto que compõe a curva. Este valor é a resistência.

3.11 ELISAs

Os hormônios sexuais e as citocinas foram mensurados no soro por ELISA. Para estradiol e testosterona utilizaram-se kits Interkit® e para as citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), kits específicos Raybiotech®.

3.12 Imunoistoquímica

Os mesmos blocos histológicos utilizados na avaliação do volume trabecular foram encaminhados para a realização da imunoistoquímica, ou seja, os cortes transversais das vértebras e da cabeça dos fêmures. Foi utilizado um método indireto para a avaliação da expressão de RANKL, RANK e OPG. Os cortes histológicos foram realizados no Laboratório de Histopatologia do DVT/UFV e o ensaio imunoistoquímico, no LBCHV/BIOAGRO-UFV.

Os cortes foram realizados em micrótomo de rotação na espessura de 4 μ m e dispostos em lâmina silanizada (Immunoslides®). Após permanecerem em estufa a 70°C por uma hora, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em concentrações decrescentes de álcool e, por fim, em PBS pH 7,4. Em seguida, procedeu-se a recuperação antigênica incubando-se os cortes com solução de tripsina (1mg/mL) por dez minutos em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas em água destilada com *Tween* 20. Para o bloqueio da biotina endógena, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de claras de ovo como fonte de avidina (1 clara para cada 100mL de água destilada) por 20 minutos. Após lavagem em água com *Tween* 20, as lâminas foram transferidas para uma solução de leite em pó desnatado como fonte de biotina (5g para 100mL de água destilada) por mais 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários (IgG de cabra anti-RANKL, IgG de cabra anti-RANK e IgG de cabra anti-OPG – todos adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Foram preparadas três lâminas de cada amostra, uma para cada anticorpo. Foi utilizada a diluição de 1:50 e incubação a 4°C por 24 horas. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Sigma) na diluição de 1:100, por 60 minutos. A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio em PBS. As lâminas foram então incubadas com o complexo marcador (Sigma) na diluição de 1:200 em câmara úmida por 60 minutos. Em seguida, a marcação foi revelada com solução de diaminobenzidina (Sigma) e peróxido de hidrogênio por dez minutos. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris e as lâminas foram então montadas com lamínulas e Entellan® (Merck).

3.13 Análises estatísticas

Com o conjunto dos dados coletados, o experimento pode ser delineado em um arranjo fatorial, cujas variáveis independentes são compostas por: tratamento (controle ou estresse), sexo (macho ou fêmea) e idade (jovem ou senil). Entretanto, como os resultados foram divididos em quatro artigos, a análise estatística foi escolhida da maneira mais apropriada para cada caso.

No primeiro artigo, que trata do peso e dos parâmetros ósseos apenas dos animais que compunham o grupo controle, foi realizada uma análise de variância do tipo 2-way, considerando sexo e idade como fatores principais. Como análise *post-hoc*, foi realizado o teste de Holm-Sidak para as interações, sempre que alguma diferença fosse detectada na análise de variância. No segundo e no terceiro artigos, as análises foram semelhantes ao primeiro, mas foram considerados fatores o sexo e o tratamento. Os pesos corporais dos animais foram submetidos a um teste t pareado para comparar os valores do início e do final do experimento. No quarto artigo, realizou-se uma análise de variância do tipo 3-way, com tratamento, sexo e idade como fatores principais, seguida também pelo teste de Holm-Sidak. No primeiro e no quarto artigos foram realizados testes de correlação de Pearson entre as diversas variáveis. Foi considerado nível de significância de 5% para todos os testes, exceto quando explanado no texto. Foram utilizados os programas computacionais SigmaPlot 11.0, Minitab Statistical Software® versão 15, e Microsoft Excel 2007, para a análise estatística e confecção dos gráficos.

3.14 Referências bibliográficas

BAKER, S. L.; KENTNER, A. C.; KONKLE, A. T.M.; BARBAGALLO, L. S.-M.; BIELAJEW, C. Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats. **Physiology & Behavior**, v.87, p.314-322, 2006.

BEKRIS, S.; ANTONIOU, K.; DASKAS, S.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI; Z. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behavioural Brain Research**, v.161, p.45-59, 2005.

CIZZA, G.; RAVN, P.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Depression: A major, unrecognized risk factor for osteoporosis? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, n.5, p.198-203, 2001.

COSTA, L. D.; VARGAS V., M. I.; VALENTE, F. L.; FERREIRA, A. P. B. R.; CHEROTO, A. L. L.; CARMO, L. A. M. Histomorfometria do fílo de ratas jovens e senis submetidas a estresse moderado crônico. In: **Simpósio de Integração Acadêmica da UFV**, 2010. Resumo disponível em: <http://www.sia.ufv.br>.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; DROSSOPOULOU, G.; SAGORARIS, M.; KOKRAS, N.; SFIKAKIS, A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? **Neuroscience**, v.135, n.3, p.703-714, 2005.

DETANICO, B. C.; PIATO, A. L.; FREITAS, J. J.; LHULLIER, F. L.; HIDALGO, M. P.; CAUMO, W.; ELISABETSKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. **European Journal of Pharmacology**, v.607, v.1-3, p.121-125, 2009.

GAMARO, G. D.; MANOLI, L. P.; TORRES, I. L. S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v.42, p.107-114, 2003.

JAYATISSA, M. N.; BISGAARD, C. F.; WEST, M. J.; WIBORG, O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. **Neuropharmacology**, v.54, p.530-541, 2008.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International**, v.54, p.358-362, 2009.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUS, F. H. ; KANIS, J. A. ; MALLUCHE, H. ; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M. ; RECKER, R. R. Bone Histomorphometry : Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.2, n.6, p.595-610, 1987.

WILNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v.134, p.319-329, 1997.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I.; BAJAYO, A.; KREISEL, T.; FELDMAN, S.; TAM, J.; TREMBOVIER, V.; CSERNUS, V.; SHOHAMI, E.; BAB, I. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.45, p.16876-16881, 2006.

4 CAPÍTULO III

**ANÁLISES DENSITOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E
BIOMECÂNICA DE OSSOS DE RATOS MACHOS E FÊMEAS, JOVENS E
SENIS, PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SEXO E DA IDADE SOBRE A
MASSA ÓSSEA.**

4.1 Resumo

Várias alterações inerentes ao processo de envelhecimento podem comprometer o metabolismo ósseo, contribuindo para o estabelecimento da osteoporose, uma doença de crescente prevalência, capaz de diminuir a qualidade de vida dos idosos. Dadas as dificuldades de conduzir experimentos em humanos, os modelos animais têm grande importância no esclarecimento das doenças. Ratos são comumente utilizados no estudo da osteoporose. Este trabalho tem por objetivo fornecer mais informações sobre as diferenças de parâmetros ósseos de ratos, segundo sexo e idade. Para isso foram utilizados cinco machos e cinco fêmeas de seis meses de idade; e cinco machos e cinco fêmeas de 22-24 meses de idade. Os animais foram pesados e, após eutanásia, tiveram os ossos coletados. Fêmur, tíbia e vértebra lombar foram submetidos a densitometria óssea. Foram realizados ainda testes biomecânicos de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur. Em análise histomorfométrica foram obtidos os volumes trabeculares da cabeça do fêmur e do corpo vertebral e medidas do osso cortical e da cavidade medular da seção transversal do fêmur. Os parâmetros de medida morfométrica mostraram-se relacionados ao tamanho do animal, verificado também pelo peso corporal. Tanto sexo e idade apresentaram efeitos importantes nesses parâmetros, em que, em geral, os valores apresentados pelos machos foram maiores que pelas fêmeas; bem como os apresentados pelos animais senis, maiores que pelos mais jovens. A densidade mineral não apresentou diferença devido à idade ou ao sexo. Os parâmetros avaliados no corpo vertebral mostraram-se pouco sensíveis aos efeitos da idade e do sexo. Força máxima e tenacidade, tanto ao teste de flexão da cabeça do fêmur quanto da diáfise, foram maiores nos machos, embora efeito da idade não tenha sido identificado. Os resultados obtidos no presente experimento apontam para a importância da escolha apropriada de um grupo controle bem como da metodologia empregada para o estudo de alterações ósseas causadas pelo envelhecimento.

Palavras-chave: sexo, envelhecimento, ratos, modelo animal, histomorfometria óssea, biomecânica, densitometria óssea.

4.2 Abstract

BONE DENSITOMETRY, HISTOMORPHOMETRY AND BIOMECHANICS OF MALE AND FEMALE, SENILE AND YOUNG RATS FOR EVALUATION OF SEX AND AGE EFFECTS ON BONE MASS

Several changes associated with aging may affect bone metabolism, contributing to the establishment of osteoporosis, an increasing prevalence disease, capable of reducing seniors welfare. Given the difficulties of conducting experiments with humans, animal models have great importance to understand the disease. Rats are commonly used in the study of osteoporosis. This paper aims to provide more information about the differences in rats bone parameters by sex and age. To do that, we used male and female rats, 6 and 22-14 months old. Animals were weighed and bones were collected. Right femur, right tibia and L4 vertebrae were analyzed by densitometry, providing bone mineral content, bone area and bone mineral density. Left femur was subjected to biomechanical bending on its head and diaphysis, providing maximum strength, stiffness and toughness. Right femur and L5 vertebra were also submitted to histomorphometric analysis to obtain means for bone trabecular volume in femoral head and vertebral body, and measures of cortical bone and marrow cavity in femoral diaphysis cross-section. Morphometric parameters were related to the size of the animal, also verified by body weight. Both sex and age had important effects on these parameters; in general means from males were larger than that obtained from females, as well as those presented by aged animals, larger than the younger ones. Mineral density showed no difference due to age or gender. Parameters evaluated in the vertebral body were shown to be insensitive to the effects of age and sex. Maximum strength and toughness in both the bending tests were higher in males, although the effect of age has not been identified. These results indicate the importance of choosing appropriate control group and methodology to studying bone changes caused by aging.

Keywords: sex, aging, rats, animal model, bone histomorphometry, biomechanics, bone densitometry.

4.3 Introdução

Embora a deficiência de estrógeno na mulher pós-menopausa seja considerada a principal causa da osteoporose (FAN et al., 2005), várias alterações relacionadas ao envelhecimento colaboram com o processo de perda óssea em ambos os sexos (GALI, 2001), visto que podem ser afetados os sistemas neuroendócrino, imunológico e de comunicação célula-célula (MEITES, 1988) – sistemas também empregados no equilíbrio do metabolismo ósseo (ANANDARAJAH, 2000; MUNDY et al., 2000). A epidemiologia da osteoporose, marcada por crescente prevalência, é modulada pelo envelhecimento da população (REGINSTER e BURLET, 2006). Em 2005, mais de 10 milhões de indivíduos apresentavam osteoporose nos EUA (SHEA e MILLER, 2005). Os dados epidemiológicos da doença em países em desenvolvimento podem ser escassos (ROCHA e RIBEIRO, 2003), mas o envelhecimento da população é um fenômeno presente em todo o planeta (TINKER, 2002). Um dos aspectos da mudança na pirâmide populacional é a maior expressão de doenças relacionadas ao envelhecimento (LIMA-COSTA e VERAS, 2003), que pode ser definido como declínio das funções fisiológicas relacionado à idade (AUSTAD, 2005). Uma dessas doenças é a osteoporose, caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido, o que torna os ossos mais frágeis, aumentando o risco de fraturas (WHO, 2003). Aos 90 anos, mulheres podem apresentar 50% da massa de osso trabecular máximo que tenha atingido ao longo de sua vida, enquanto os homens podem apresentar perdas entre 10 e 25% (KIEBZAK, 1991). Ratos são comumente empregados para o estudo da osteoporose senil (WANG et al., 2001; SIPOS et al., 2008; VANLEENE et al., 2008), ainda que existam divergências com observações feitas em humanos (MOSEKILDE, 1995). O presente trabalho descreve as diferenças entre alguns parâmetros ósseos de ratos de seis meses e 22-24 meses de idade, de ambos os sexos, com o objetivo de contribuir para a caracterização deste modelo, fornecendo mais uma fonte de informação a seu respeito e encorajando sua utilização para o estudo da osteoporose senil.

4.4 Material e métodos

4.4.1 Animais

As práticas adotadas neste experimento foram aprovadas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Processo 52/2009), com base na legislação vigente. Vinte ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), 5 machos e 5 fêmeas com 6 meses de idade, e o mesmo número de animais entre 22 e 24 meses, foram obtidos do Biotério Central da UFV. Os animais senis faziam parte do grupo de matrizes de reprodução do biotério e seriam descartados com cerca de 12 meses de idade, quando foram então adquiridos para o presente trabalho. Durante um ano, eles foram mantidos em sala climatizada, recebendo apenas água e ração comercial, até que atingissem a idade desejada para o estudo. Neste período, um macho e uma fêmea vieram a óbito, deixando cada grupo senil com quatro indivíduos. Os animais foram pesados e, após eutanásia, foram necropsiados e tiveram fêmures, tíbias e vértebras lombares coletados e dissecados.

4.4.2 Densitometria e teste biomecânico

Fêmur e tíbia direitos, bem como vértebra L4, que teve seus processos previamente retirados com um alicate, foram avaliados por DXA (Densitômetro Lunar DPX A). Conteúdo mineral ósseo (CMO, em g), área do osso (cm²) e densidade mineral óssea (DMO, em g/cm²) foram determinados no teste.

O fêmur esquerdo foi submetido ao teste mecânico em aparelho EMIC®, realizado com célula de carga de 2000N a 20 mm/min. Dois testes foram realizados: a flexão da cabeça do fêmur e a flexão da diáfise do fêmur; para cada um obtiveram-se a força máxima (em N) suportada pelo osso, a rigidez (em N/mm) e a tenacidade.

4.4.3 Histomorfometria

Vértebra L5 e fêmur direito foram fixados em formol, descalcificados em solução de ácido fórmico e incluídos em parafina. Foram realizados três cortes de cada amostra com 4 μ m de espessura, distantes pelo menos 20 μ m entre si. A região de osso trabecular abaixo da linha de crescimento da cabeça do fêmur e das extremidades cranial e caudal do corpo da vértebra foi fotografada em microscópio, no aumento de 100X. Uma grade de 12 linhas e 16 colunas (192 interseções), distantes 8 μ m entre si, foi sobreposta às imagens e o volume trabecular ósseo (BV/TV), obtido por planimetria por contagem de pontos, em %.

Cortes transversais da porção média da diáfise do fêmur foram fotografados em aumento de 25x. A análise das imagens forneceu as seguintes medidas, padronizadas segundo Parfitt et al. (1987): diâmetro médio total e da cavidade medular (B.Dm e Ma.Dm, em μ m), espessura do osso cortical (Ct.Wi, μ m), perímetro total e da cavidade medular (B.Pm e Ma.Pm, μ m), área total e da cavidade medular (B.Ar e Ma.Ar, em μ m²). Os valores para diâmetro e espessura de cada animal foram calculados como a média de oito mensurações em diferentes sentidos, em cada uma das três repetições. A partir destes dados foram calculadas as relações entre osso cortical e cavidade medular Ct.Wi/Ma.Dm e Ct.Ar/Ma.Ar.

4.4.4 Análises Estatísticas

Foram determinados os efeitos do sexo e da idade, bem como da interação destes fatores, sobre o peso e os parâmetros ósseos submetendo os dados a uma análise de variância do tipo 2-way. Em caso de efeito significativo, foi empregado o teste de Holm-Sidak como teste *post-hoc*. Quando as pressuposições da análise de variância não se cumpriram, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. A relação entre as observações foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5% para todas as análises, ou como especificado na descrição dos resultados.

4.5 Resultados

4.5.1 Peso Corporal

A análise de variância revelou que o peso depende diretamente da idade ($p < 0,001$) e do sexo ($p < 0,001$), mostrando que machos são mais pesados que fêmeas, e senis, mais pesados que jovens. Entretanto, as duas variáveis independentes apresentaram interação entre si para a resposta do peso corporal ($p = 0,024$). A análise *post-hoc* mostrou que dentro da mesma idade, machos diferem consideravelmente das fêmeas; entretanto, a diferença entre as idades dentro do mesmo sexo, não foi detectada nas fêmeas (Figura 4.1), sugerindo que o incremento de peso ao longo do tempo seja mais pronunciado nos machos que nas fêmeas.

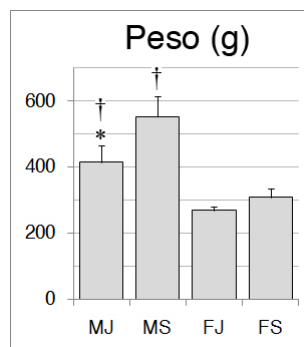


Figura 4.1 Variação do peso corporal, em gramas (g), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

4.5.2 Densitometria

CMO femoral apresentou efeito somente do sexo como fator principal ($p < 0,001$) na análise de variância, sendo as médias dos machos maiores que das fêmeas. O teste *post-hoc* identificou apenas a diferença entre machos jovens e machos senis e entre machos senis e fêmeas senis (Figura 4.2 A). O efeito principal exibido na análise de variância para CMO tibial também indicou que as médias dos machos foram maiores que das fêmeas ($p = 0,002$). Entretanto, a interação entre sexo e idade também foi detectada ($p = 0,033$). O teste *post-hoc* para a tibia mostrou significância semelhante à do fêmur (Figura 4.2 B), ou seja, o acúmulo mineral nestes ossos ao longo do tempo é mais pronunciado nos machos, além de naturalmente apresentarem médias maiores que as fêmeas. Nenhuma diferença estatística foi detectada para CMO vertebral (Figura 4.2 C).

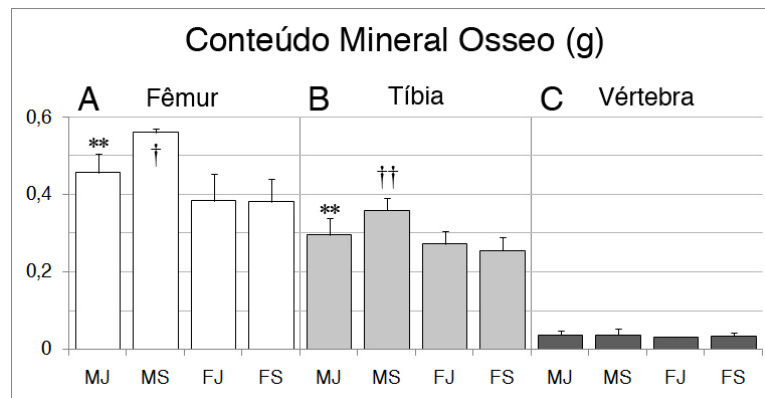


Figura 4.2 Variação do conteúdo mineral ósseo, em gramas (g), do fêmur (A), da tibia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A área do fêmur aferida durante a análise densitométrica mostrou efeito independente do sexo e da idade na análise de variância (respectivamente, $p < 0,001$ e $p = 0,024$). As médias apresentadas pelos machos são maiores que as fêmeas, bem como as médias dos animais senis, maiores que dos jovens. O teste *post-hoc* foi capaz de detectar a diferença entre os sexos, mas, quanto à idade, apenas a variação entre os machos ficou evidente (Figura 4.3 A). Já a área da tíbia revelou efeito apenas do sexo ($p < 0,001$). O teste *post-hoc* comprovou que os machos têm uma área óssea tibial maior que as fêmeas (Figura 4.3 B). Para o corpo vertebral, a análise estatística não mostrou qualquer diferença significativa (Figura 4.3 C).

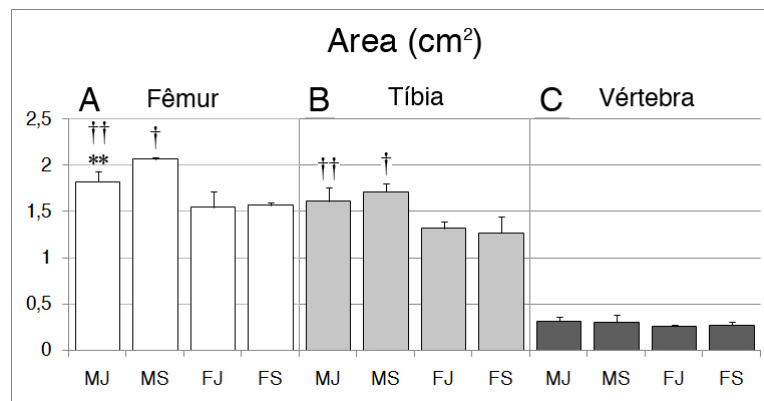


Figura 4.3 Variação da área, em cm^2 , do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A DMO não apresentou diferença significativa em qualquer dos três ossos, nem para sexo ou idade como efeito principal, nem para a interação entre as variáveis independentes (Figura 4.4).

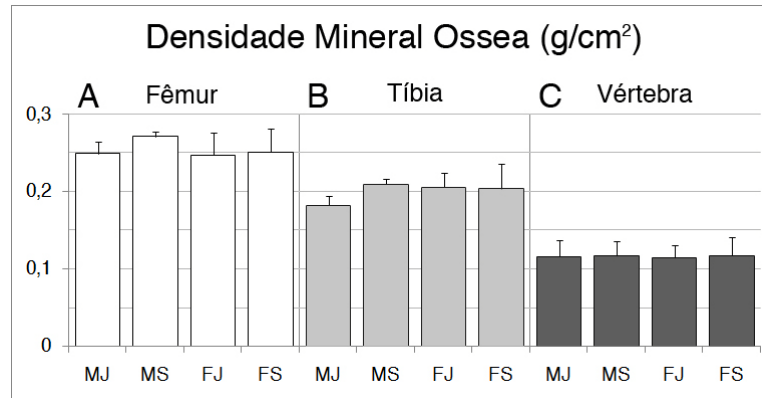


Figura 4.4 Variação da densidade mineral óssea, em g/cm², do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * p<0,001 e ** p<0,05; entre sexos dentro da mesma idade: † p<0,001 e †† p<0,05.

A correlação entre CMO e Área em cada osso é alta (fêmur: 0,913; tíbia: 0,831; e vértebra: 0,901). Com exceção da vértebra, CMO guarda ainda correlação significativa com o peso do animal (fêmur: 0,876; e tíbia: 0,748). E apenas a DMO do fêmur e da tíbia mostraram correlação entre si, embora moderada (0,679). Área do fêmur e área da tíbia também apresentaram correlação significativa com o peso dos animais, com coeficientes de correlação de 0,911 e 0,785, respectivamente.

4.5.3 Histomorfometria

Quanto aos valores de área total da seção transversal da diáfise do fêmur, a análise de variância mostrou que o sexo apresenta efeito principal ($p < 0,001$), com valores maiores nos ratos machos. O teste *post-hoc* foi capaz de identificar que além de ser maior nos machos, B.Ar também é maior nas fêmeas senis em relação com as fêmeas jovens (Figura 4.5 A). Para Ma.Ar, sexo e idade mostraram efeito independente na análise de variância (respectivamente, $p = 0,002$ e $p = 0,008$), com valores médias maiores nos machos em relação às fêmeas, e nos senis em relação aos jovens. O teste *post-hoc* identificou apenas as diferenças entre fêmeas jovens e fêmeas senis, e entre machos jovens e fêmeas jovens (Figura 4.5 B). Já Ct.Ar apresentou apenas o efeito do sexo na análise de variância ($p = 0,003$) e o teste *post-hoc* evidenciou somente as diferenças entre machos jovens e fêmeas jovens (Figura 4.5 C).

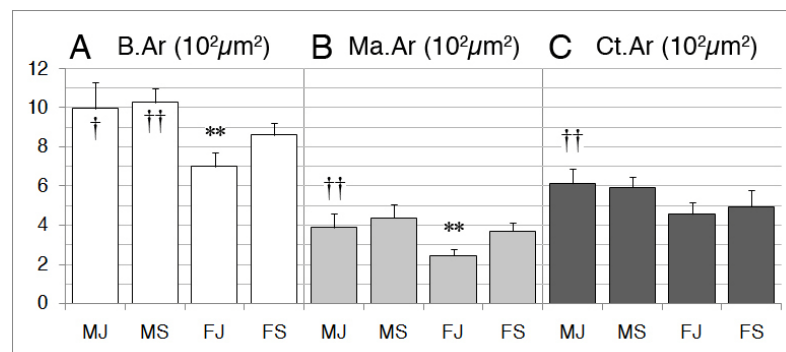


Figura 4.5 Variação da área total (A), da cavidade medular (B) e do osso cortical (C) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm^2 , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Os valores para diâmetro total e da cavidade medular mostraram, na análise de variância, efeito do sexo ($p < 0,001$, para ambas as medidas), com as maiores médias entre os machos. A idade mostrou efeito apenas para o diâmetro da cavidade medular ($p = 0,005$), que mostrou-se maior nos animais mais velhos. O teste *post-hoc* mostrou comportamento semelhante nas duas medidas, com valores maiores em machos e diferenças entre idades apenas nas fêmeas (Figura 4.6 A e B). A espessura do osso cortical não apresentou qualquer diferença significativa entre os grupos (Figura 4.6 C).

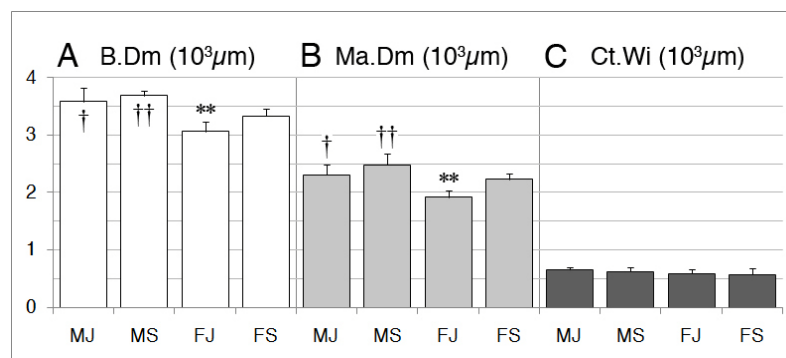


Figura 4.6 Variação dos diâmetros total (A) e da cavidade medular (B) e da espessura do osso cortical (C) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Os efeitos do sexo e da idade mostraram-se significativos em ambas as medidas de perímetro realizadas na seção transversal da diáfise do fêmur. O perímetro total dos machos é maior que das fêmeas ($p < 0,001$), bem como dos senis, maior que dos jovens ($p = 0,020$). No teste de Holm-Sidak, as diferenças no perímetro total ficaram evidentes apenas entre os sexos (Figura 4.7 A). O perímetro da cavidade medular mostrou comportamento semelhante ao total na análise de variância, quanto ao sexo ($p < 0,001$) e à idade ($p = 0,002$), sendo os efeitos de ambas as variáveis independentes demonstrados no teste *post-hoc* (Figura 4.7 B).

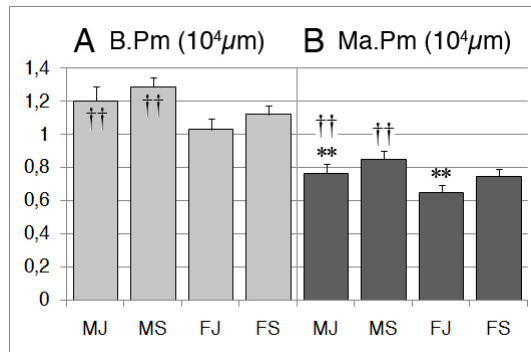


Figura 4.7 Variação do perímetro total (A) e da cavidade medular (B) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A relação entre a medida da espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular não mostrou qualquer diferença significativa entre os grupos ou os fatores sexo e idade (Figura 4.8 A). Já a relação entre as áreas (Ct.Ar/Ma.Ar) mostrou-se maior nos animais senis, na análise de variância ($p=0,039$), embora o teste de Holm-Sidak tenha evidenciado esta diferença apenas entre as fêmeas (Figura 4.8 B).

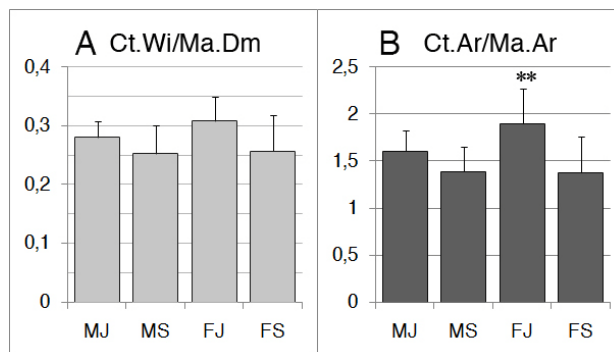


Figura 4.8 Variação da relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular (A) e entre a área do osso cortical e a área da cavidade medular (B) do corte transversal da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

O peso dos animais apresentou correlação variável entre média e alta com as medidas da seção transversal: B.Ar ($r=0,848$), B.Pm ($r=0,887$), Ma.Ar ($r=0,726$), Ma.Pm ($r=0,796$), Ma.Dm ($r=0,740$), B.Dm ($r=0,879$), Ct.Ar ($r=0,764$). As exceções ficaram com Ct.Wi ($p=0,093$) e as relações Ct.Wi/Ma.Dm ($p=0,392$) e Ct.Ar/Ma.Ar ($p=0,313$), que não apresentaram correlação com o peso corporal dos animais. De maneira semelhante apresentou-se a correlação entre a área do fêmur, obtida na densitometria (dados não apresentados).

Quanto ao volume trabecular ósseo (BV/TV), as diferenças foram significativas apenas para o fêmur, em que a diferença entre os sexos identificada na análise de variância ($p < 0,001$) foi evidenciada no teste *post-hoc* (Figura 4.9). Não houve correlação entre DMO e BV/TV dos ossos ($p > 0,050$, para ambas as comparações).

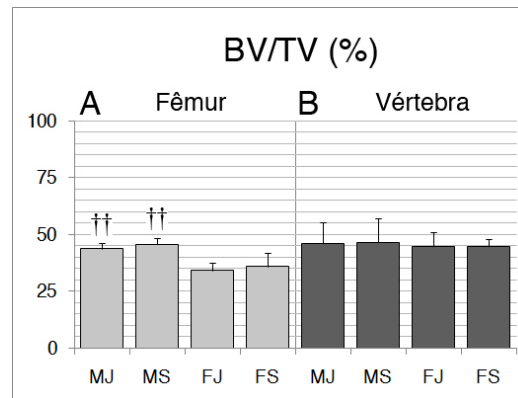


Figura 4.9 Variação do volume trabecular ósseo (BV/TV) na cabeça do fêmur (A) e no corpo vertebral (B), em %, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

4.5.4 Teste Biomecânico

A força máxima atingida no teste biomecânico de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur apresentou diferença significativa na análise de variância por efeito do sexo ($p < 0,001$ e $p = 0,046$, respectivamente), porém o teste *post-hoc* foi capaz de detectar este efeito apenas na cabeça do fêmur (Figura 4.10), com as médias apresentadas pelos machos jovens maiores que fêmeas jovens, e machos senis maiores que fêmeas senis.

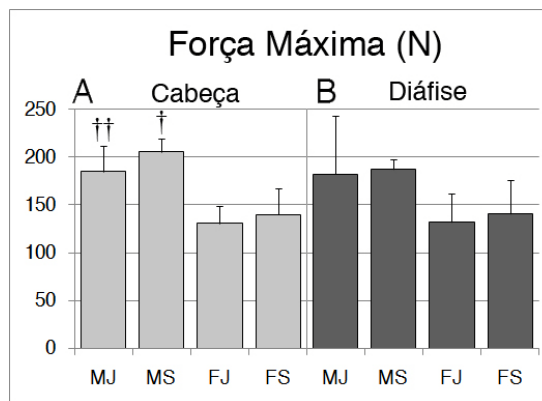


Figura 4.10 Variação da força máxima suportada, em N, no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A análise de variância mostrou que a tenacidade da cabeça do fêmur, mensurada no teste de flexão, depende do sexo do animal ($p=0,020$), sendo maior nos machos. O teste *post-hoc* evidenciou esta diferença apenas entre os animais jovens (Figura 4.11 A). Para a tenacidade da diáfise, sexo também se mostrou um fator determinante ($p=0,005$), porém o teste de Holm-Sidak identificou a diferença apenas entre os animais senis (Figura 4.11 B).

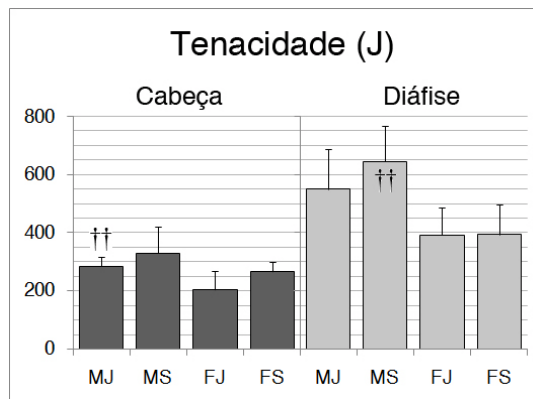


Figura 4.11 Variação da tenacidade, em J, apresentada no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre idades dentro do mesmo sexo: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre sexos dentro da mesma idade: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

Os valores para rigidez obtidos tanto para a cabeça quanto para a flexão do fêmur foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, pois não cumpriram os pré-requisitos da análise de variância. Entretanto nenhuma diferença pôde ser encontrada ($p=0,415$ e $p=0,485$, respectivamente) (Figura 4.12).

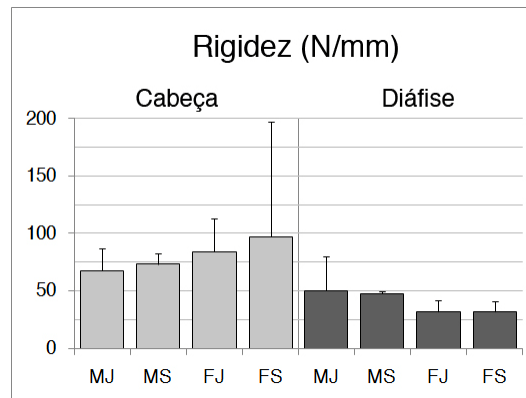


Figura 4.12 Variação da rigidez, em N/mm, apresentada no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis.

Força máxima e tenacidade obtidas nos dois testes guardam alguma correlação com os parâmetros avaliados histomorfometricamente na seção transversal da diáfise do fêmur. A força máxima atingida no teste de flexão da cabeça do fêmur apresentou ainda correlação de 0,746 com BV/TV do fêmur. Já a força máxima na flexão da diáfise mostrou correlação de 0,628 com a DMO do osso.

4.6 Discussão

Os animais de 22-24 meses de idade utilizados neste experimento eram mais pesados que os de seis meses. Ratos podem aumentar sua massa corporal até cerca de 18 meses de idade, mesmo o início da puberdade ocorrendo por volta dos 3 meses (SENGUPTA et al., 2005). O aumento contínuo do peso corporal com o avanço da idade também é visto em camundongos utilizados para o estudo da osteoporose senil (GLATT et al., 2007). A densitometria óssea é a ferramenta padrão para o diagnóstico da osteoporose com base em parâmetros definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994). Entretanto, o resultado pode variar de acordo com a metodologia utilizada (FAULKNER et al., 1999; BLAKE et al., 2002), com a parte do esqueleto analisada (EL MAGHRAOUI et al., 2007; MOUNACH et al., 2009), e com a composição corporal do paciente (SAARELAINEN et al., 2007). Parte desta diferença ocorre porque, apesar de a osteoporose ser uma doença sistêmica, a perda óssea não é uniforme dentro do esqueleto (SHEA e MILLER, 2005), pois a atividade das células ósseas depende da irrigação sanguínea local e estimulação mecânica (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000; HAZENBERG et al., 2006). Na clínica médica, o aferimento do risco de fratura torna-se então muito mais confiável quando associado a fatores de risco clínicos, como histórico familiar, risco de queda, atividade física, e outros (LESLIE et al., 2002; SYED e KHAN, 2002). No presente experimento, a DMO dos animais não mostrou diferenças entre sexo e idade. É importante lembrar que a análise foi feita no órgão como um todo, ou seja, o resultado não reflete apenas a densidade do tecido ósseo, mas também dos outros tipos de tecido que compõem os ossos (FAULKNER e MILLER, 2008). Os resultados do presente trabalho estão em concordância com Sengupta et al. (2005), que avaliou DMO de ratos Sprague-Dawley e constatou que a massa óssea atingida à puberdade, ou seja, em torno de três meses de idade, permaneceu constante até os 36 meses. Mesmo para humanos esta medida pode ser controversa – mesmo que apresentem a mesma DMO que as jovens, mulheres mais velhas apresentam maior risco de fratura (RUBIN et al., 1999). Glatt et al (2007) verificaram em camundongos de um a 20 meses, além do aumento do peso corporal, um acúmulo progressivo de DMO total, mas diminuição de BV/TV à partir de 6-8 semanas de idade. Em hamsters, analisados entre três a 24 meses, o acúmulo de massa óssea progrediu até 6-12 meses, a área da cortical permaneceu constante, embora a espessura tenha

diminuído (CHEN et al., 2008). É importante ter em mente que, embora sejam correlacionados, em termos absolutos, a área do osso cortical não necessariamente acompanha sua espessura no corte transversal, pois depende também do diâmetro da cavidade medular. A Figura 4.13 esquematiza as relações entre área e espessura em um diagrama que representa uma seção transversal da diáfise do fêmur: entre A e B, a espessura da cortical é mantida, mas o diâmetro da cavidade medular em B é o dobro da representada em A. Na tabela estão calculados os valores para as mesmas medidas feitas na histomorfometria óssea deste trabalho. Adicionalmente, os valores para uma situação é apresentada na coluna C, cujo valor para Ma.Dm é o triplo de A.

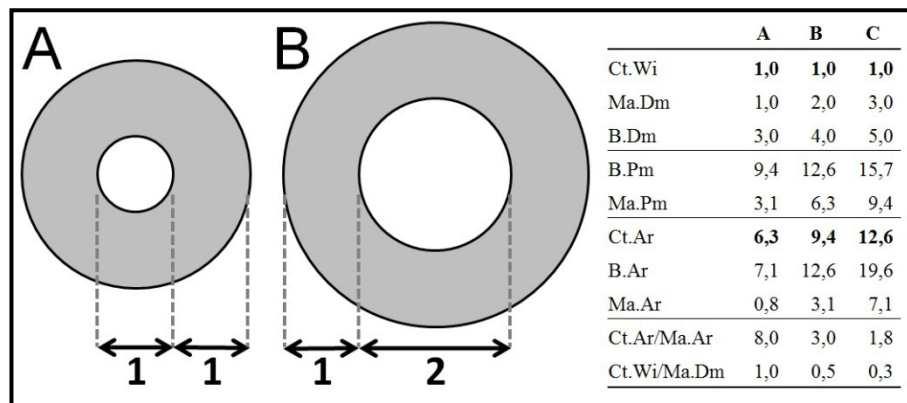


Figura 4.13 Representação esquemática das relações entre osso cortical e cavidade medular. Nos círculos apresentados, a área cinza representa o osso cortical e o círculo branco interno, a cavidade medular. A e B apresentam a mesma espessura do osso cortical. Entretanto a variação do diâmetro da cavidade medular altera a área do osso cortical (Consultar o texto).

Utilizando camundongos C57BL/6J machos, Halloran et al. (2002) observaram que a espessura do osso cortical diminuiu 12% entre seis e 24 semanas de idade, embora a área permanecesse constante. Os autores notaram ainda uma diminuição de BV/TV de 60% nos animais mais velhos. Neste mesmo tipo de camundongos, a reabsorção endocortical aumentou com a idade e o crescimento do perímetro periosteal mostrou-se constante (FERGUSON et al., 2003). As diferenças observadas no presente trabalho para sexo e idade na seção transversal do fêmur são similares ao que ocorre em humanos, em que há aumento do diâmetro da cavidade medular, com aposição periosteal compensatória; tal mecanismo é mais pronunciado nos indivíduos do sexo masculino (RUSSO et al., 2006). Em humanos, as correlações entre BV/TV nos

diversos pontos estudados variam de 0,13 a 0,56 (ECKSTEIN et al., 2007). Entre ratos Sprague-Dawley machos de cinco e 23 meses, Pietschmann et al. (2007) encontraram o efeito deletério do envelhecimento sobre DMO do osso trabecular, volume ósseo e número de trabéculas na tíbia proximal. Adaptações na forma geométrica do osso poderiam aumentar a força do colo femoral durante a fase adulta, mesmo a que a DMO tenha atingido um patamar (PETIT et al., 2004). Eckstein et al. (2007), cujo estudo envolveu homens e mulheres a partir de 52 anos, mostraram que as propriedades microestruturais do osso trabecular são heterogêneas ao longo do esqueleto e que a diferença entre homens e mulheres não ocorre em todos os sítios, mas coincidem com os locais de maior incidência de fraturas. Em ratos, as fraturas osteoporóticas não ocorrem e, para verificar a fragilidade do osso, emprega-se o teste biomecânico (TURNER et al., 2001). Muitos fatores podem influenciar neste teste, como o tipo de osso, a temperatura, o grau de hidratação e de autólise; por isso, os dados devem ser sempre relativos (TURNER e BURR, 1993). A correlação entre a força máxima da cabeça do fêmur com BV/TV neste trabalho foi maior que a entre força máxima da diáfise e DMO. Em análise *ex vivo*, ossos humanos guardam alta correlação entre DMO e força máxima no teste de flexão (AMMANN, 2009). Weinstein et al. (2010) correlacionaram DMO vertebral de camundongos, aferida *in vivo*, com a avaliação biomecânica do mesmo sítio em ensaio *ex vivo*, com resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. As alterações biomecânicas envolvidas no processo de envelhecimento não têm apenas relação com as alterações morfométricas, mas também com mudanças na composição da matriz (AKKUS et al., 2004; VANLEENE et al., 2008). Para Kalu (1999), a utilização de fêmeas virgens no estudo da osteoporose em ratos senis contornaria um problema que pode ocorrer em ratas descartadas de criadouros: a depleção de osso trabecular. Os animais utilizados no presente trabalho eram matrizes de criação em um biotério. Apesar de não haver informação disponível sobre a paridade desses animais, as únicas interações entre sexo e idade apresentadas foram para o peso corporal e para o CMO da tíbia, que é relacionado ao tamanho do animal e seu valor compensa-se na medida da DMO. Em mulheres ainda, o número de partos correlaciona-se negativamente com o risco de fratura do colo femoral, o que não parece ter relação com DMO (HILLIER et al., 2003).

4.7 Conclusão

Os parâmetros de medida morfométrica dos ossos dos ratos empregados neste trabalho dependem do tamanho do animal, que pode ser verificado também pelo peso corporal. Sexo e idade têm importante efeito nessa questão: machos são maiores que fêmeas, bem como os animais considerados senis, ou seja, com 22 a 24 meses de idade, são maiores que os mais jovens, de seis meses. A densidade mineral, parâmetro importante na avaliação da perda de massa óssea, não apresentou diferença devido à idade ou ao sexo. Os parâmetros avaliados no corpo vertebral mostraram-se pouco sensíveis aos efeitos da idade e do sexo. Força máxima e tenacidade, tanto ao teste de flexão da cabeça do fêmur quanto da diáfise, foram maiores nos machos, embora efeito da idade não tenha sido identificado. Os resultados obtidos no presente experimento apontam para a importância da escolha apropriada de um grupo controle bem como da metodologia empregada para o estudo de alterações ósseas causadas pelo envelhecimento.

4.8 Referências bibliográficas

AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, v.34, p.443-453, 2004.

AMMANN, P. Bone strength and ultrastructure. **Osteoporosis Int**, v.20, p.1081-1083, 2009.

ANANDARAJAH, A. P. Role of RANKL in bone diseases. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.20, n.2, p.88-94, 2009.

AUSTAD, S. N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.126, p.43-49, 2005.

BLAKE, G. M.; KNAPP, K. M.; FOGELMAN, I. Absolute fracture risk varies with bone densitometry technique used. **Journal of Clinical Densitometry**, v.5, n.2, p.109-116, 2002.

CHEN, H.; ZHOU, X.; WASHIMI, Y.; SHOUMURA, S. Three-dimensional microstructure of the bone in a hamster model of senile osteoporosis. **Bone**, v. 43, p.494-500, 2008.

ECKSTEIN, F.; MATSUURA, M.; KUHN, V.; PRIEMEL, M.; MÜLLER, R.; LINK, T. M.; LOCHMÜLLER, E.-M. Sex differences of human trabecular bone microstructure in aging are site-dependent. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.22, n.6, p.817-824, 2007.

EL MAGHRAOUI, A.; MOUINGA ABAYI, D. A.; RKAIN, H.; MOUNACH, A. Discordance in diagnosis of osteoporosis using spine and hip bone densitometry. **Journal of Clinical Densitometry**, v.10, n.2, p.153-156, 2007.

FAN, Y.; LIU, J.; WANG, S.; WANG, H.; SHI, F.; XIONG, L.; HE, W.; PENG, X. Functional Proteome of Bones in Rats with Osteoporosis Following Ovariectomy. **Life Sciences**, v. 76, p. 2893-2901. 2005.

FAULKNER, K. G.; MILLER, P. D.; Clinical Use of Bone Densitometry, In: Marcus, R.; Feldman, D.; Nelson, D. A.; Rosen, C. J. (Ed) **Osteoporosis** (3ed), Academic Press: San Diego, 2008, p.1493-1518.

FAULKNER, K. G.; VON STETTEN, E.; MILLER, P. Discordance in patient classification using T-scores. **Journal of Clinical Densitometry**, v.2, n.3, p.343-350, 1999.

FERGUSON, V. L.; AYERS, R. A.; BATEMAN, T. A.; SIMSKE, S. J. Bone development and age related bone loss in male C57BL/6J mice. **Bone**, v.33, p.387-398, 2003.

GALI, J. C. Osteoporose. **Revista Acta Ortopedica Brasileira**, v. 9, p. 53-62. 2001.

GLATT, V.; CANALIS, E.; STADMAYER, L.; BOUXSEIN, M. L. Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.22, n.8, p.1197-1207, 2007.

HALLORAN, B. P.; FERGUSON, V. L.; SIMSKE, S. J.; BURGHARDT, A.; VENTON, L. L.; MAJUMDAR, S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.17, n.6, p.1044-1050, 2002.

HAZENBERG, J. G.; LEE, T. C.; TAYLOR, D. The Role of Osteocytes in Functional Bone adaptation. **BoneKey-Osteovision**, v. 3, p. 10-16, 2006.

HILLIER, T. A.; RIZZO, J. H.; PEDULA, K. L.; STONE, K. L.; CAULEY, J. A.; BAUER, D. C.; CUMMINGS, S. R. Nulliparity and fracture risk in older women: The study of osteoporotic fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.18, n.5, p.893-899, 2003.

KALU, D. N. Animal models of the aging skeleton. In: ROSEN, C. J.; GLOWACKI, J.; BILEZIKIAN, J. P. (Eds). **The aging skeleton**. Academic Press: San Diego, 1999, p.37-50.

KIEBZAK, G. M. Age-related bone changes. **Experimental Gerontology**, v.26, p.171-187, 1991.

LESLIE, W. D.; METGE, C.; SALAMON, E. A.; YUEN, C. K. Bone mineral density testing in healthy postmenopausal women. **Journal of Clinical Densitometry**, v.5, n.2, p.117-130, 2002.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde Pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.3, p.700-701, 2003.

MEITES, J. Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. **Experimental Gerontology**, v.23, p.349-358, 1988.

MOSEKILDE, L. Assessing bone quality in animal models. **Bone**, v.17, n.4, p.343S-352S, 1995.

MOUNACH, A.; ABAYI, M.; GHAZI, M.; GHOZLANI, I.; NOUIJAI, A.; ACHEMLAL, L.; BEZZA, A.; EL MAGHRAOUI, A. Discordance between hip and spine bone mineral density measurement using DXA: Prevalence and risk factors. **Semin Arthritis Rheum**, v.38, p.467-471, 2009.

MUNDY, G. R.; OYAJOB, B.; GUTIERREZ, G.; STERLING, J.; PADALECKI, S.; ELEFTERIOU, F.; ZHAO, M. Cytokines and bone remodeling. Chapter 18, **Osteoporosis**, 3rd Edition, MARCUS, FELDMAN, NELSON, ROSEN, 2008.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUS, F. H. ; KANIS, J. A. ; MALLUCHE, H. ; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M. ; RECKER, R. R. Bone Histomorphometry : Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.2, n.6, p.595-610, 1987.

PETIT, M. A.; BECK, T. J.; LIN, H.-M.; BENTLEY, C.; LEGRO, R. S.; LLOYD, T. Femoral bone structural geometry adapts to mechanical loading and is influenced by sex steroids: The Penn State Young Women's Health Study. **Bone**, v.35, p.750-759, 2004.

PIETSCHMANN, P.; SKALICKY, M.; KNEISSEL, M.; RAUNER, M.; HOFBAUER, G.; STUPPHANN, D.; VIIDIK, A. Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. **Experimental Gerontology**, v.42, p.1099-1108, 2007.

REGINSTER, J.-Y.; BURLET, N. Osteoporosis: A Still Increasing Prevalence. **Bone**, v.38, p. S4-S9. 2006.

ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, A. R. Low Incidence of Hip Fractures in an Equatorial Area. **Osteoporosis International**, v. 14, p. 496-499. 2003.

RUBIN, J., RUBIN, H., RUBIN, C. Constraints of experimental paradigms used to model the aging skeleton. In: ROSEN, C.; GLOWACKI, J.; BILIZEKIAN, J. **The Aging Skeleton**. Acad. Press, 1999, Ch.4; p.27-36.

RUSSO, C. R.; LAURETANI, F.; SEEMAN, E.; BARTALI, B.; BANDINELLI, S.; DI IORIO, A.; GURALNIK, J.; FERRUCCI, L. Structural Adaptations to Bone Loss in Ageing Men and Women. **Bone**, v. 38, p. 112-118, 2006.

SAARELAINEN, J.; RIKKONEN, T.; HONKANEN, R.; KRÖGER, H.; TUPPURAINEN, M. Is discordance in bone measurements affected by body composition or anthropometry? A comparative study between peripheral and central devices. **Journal of Clinical Densitometry**, v.10, n.3, p.312-318, 2007.

SENGUPTA, S.; ARSHAD, M.; SHARMA, S.; DUBEY, M.; SINGH, M. M. Attainment of peak bone mass and bone turnover rate in relation to estrous cycle, pregnancy and lactation in colony-bred Sprague-Dawley rats: Suitability for studies on pathophysiology of bone and therapeutic measures for its management. **Journal of Steroids Biochemistry & Molecular Biology**, v.94, p.421-429, 2005.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal Function and Structure: Implications for Tissue-Target Therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.945-957, 2005.

SIPOS, W.; RAUNER, M.; SKALICKY, M.; VIIDIK, A.; HOFBAUER, G.; SCHETT, G.; REDLICH, K.; LANG, S.; PIETSCHMANN, P. Running has a negative effect on bone metabolism and proinflammatory status in male aged rats. **Experimental Gerontology**, v.43, p.578-583, 2008.

SYED, Z.; KHAN, A. Bone densitometry: Applications and limitations. **J Obstet Gynaecol Cac**, v.24, n.6, p.476-485, 2002.

TINKER, A. The social implications of an ageing population. *Mechanisms of Ageing and Development*, v.123, p.729-735, 2002.

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

TURNER, R. T.; MARAN, A.; LOTINUN, S.; HEFFERAN, T.; EVANS, G. L.; ZHANG, M.; SIBONGA, J. D. Animal models for osteoporosis. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.2, p.117-127, 2001.

TYNAN, R. J.; NAICKER, S.; HINWOOD, M.; NALIVAICO, E.; BULLER, K. M.; VANLEENE, M.; REY, C.; HO BA THO, M.-C. Relationships between density and Young's modulus with microporosity and physico-chemical properties of Wistar rat cortical bone from growth to senescence. **Medical Engineering & Physics**, v.30, p.1049-1056, 2008.

WANG, L.; BANU, J.; McMAHAN, C. A.; KALU, D. N. Male rodent model of age-related bone loss in men. **Bone**, v.29, n.2, p.141-148, 2001.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and Osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v. 108, p. 153-164. 2000.

WEINSTEIN, R. S.; WAN, C.; LIU, Q.; WANG, Y.; ALMEIDA, M.; O'BRIEN, C. A.; THOSTENSON, J.; ROBERSON, P. K.; BOSKEY, A. L.; CLEMENS, T. L.; MANOLAGAS, S. C. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. **Aging Cell**, v.9, p.147-161, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series, v.843, 130p., 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis. WHO Technical Report Series, v. 921, 193p. 2003.

5 CAPÍTULO IV

**EFEITO DO ESTRESSE MODERADO CRÔNICO
SOBRE PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO ÓSSEA EM RATOS ADULTOS
MACHOS E FÊMEAS**

5.1 Resumo

A osteoporose é uma doença de causa multifatorial, de alta prevalência e que compromete consideravelmente a qualidade de vida das pessoas. O comprometimento da estrutura óssea leva ao aumento do risco de fraturas, que se mostram muito debilitantes. Com a observação de que pacientes com depressão apresentavam densidade mineral óssea mais baixa que indivíduos saudáveis, percebeu-se que o estresse pode ser um agravante na perda óssea. O presente trabalho avalia o efeito de um protocolo de estresse moderado crônico sobre parâmetros ósseos de ratos machos e fêmeas. Para isso, cinco animais de cada sexo, com cinco meses de idade, foram submetidos a um cronograma de aplicação de estressores durante 28 dias. Foram incluídos frio, calor, imobilização, inclinação da gaiola, isolamento, luz noturna e privação de água e de ração, como estressores. Como grupo controle, cinco animais de cada sexo foram mantidos em gaiola duas gaiolas coletivas, com água e ração à vontade, sem qualquer outro tipo de intervenção. Os animais foram pesados no início e no final do período, e, após eutanásia, tiveram seus ossos coletados. Fêmur, tíbia e vértebra lombar foram submetidos a densitometria óssea. Foram realizados ainda testes biomecânicos de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur. Em análise histomorfométrica foram obtidos os volumes trabeculares da cabeça do fêmur e do corpo vertebral e medidas do osso cortical e da cavidade medular da seção transversal do fêmur. O estresse mostrou-se capaz de diminuir a densidade mineral óssea, bem como a espessura do osso cortical da seção transversal da diáfise do fêmur, além de diminuir o peso dos animais. Na cabeça do fêmur, o estresse ainda diminuiu a o volume trabecular ósseo e a força máxima atingida no teste de flexão. O efeito do sexo apareceu em quase todos os parâmetros, em que as médias exibidas pelos machos foram menores que as fêmeas. Com isso, confirma-se que o estresse pode comprometer o equilíbrio da homeostase óssea, colaborando para o estabelecimento da osteopenia ou osteoporose.

Palavras-chave: osteoporose, estresse, modelo animal, ratos, densitometria óssea, biomecânica óssea, histomorfometria.

5.2 Abstract

EFFECTS OF CHRONIC MILD STRESS ON BONE PARAMETERS OF MALE AND FEMALE RATS.

Osteoporosis is a disease caused by multiple factors. It presents high prevalence and impairs welfare. The disease causes bone loss leading to increased risk of fractures, which may be very debilitating. Based on observation that patients with depression had lower bone mineral density than healthy individuals, it was noted that stress can be an aggravating factor in bone loss. This study evaluates the effect of a chronic mild stress protocol on bone parameters of male and female rats. To do that, animals of both sexes, with 5 months of age were subjected to a schedule of stressors application during 28 days. We included cold, heat, immobilization, tilt cage, isolation, deprivation of water and food, and night light, as stressors. Animals of both sexes, young and aged were kept with water and feed at will, with no interventions, to serve as control. Rats were weighed, euthanized, and blood and bones were collected. Right femur, right tibia and L4 vertebrae were analyzed by densitometry, providing bone mineral content, bone area and bone mineral density. Left femur was subjected to biomechanical bending on its head and diaphysis, providing maximum strength, stiffness and toughness. Right femur and L5 vertebra were also submitted to histomorphometric analysis to obtain means for bone trabecular volume in femoral head and vertebral body, and measures of cortical bone and marrow cavity in femoral diaphysis cross-section. Stress was able to decrease bone mineral density, thickness of cortical bone of femoral diaphysis cross-section and body weight of animals. Stress also decreased trabecular bone volume and maximum strength reached in the bending test in femoral head. Effect of sex was evident in almost all parameters; means displayed by males were smaller than females. Thus, it is confirmed that stress can impair bone homeostasis, contributing to the establishment of osteopenia or osteoporosis.

Keywords: osteoporosis, stress, animal model, rats, bone densitometry, biomechanics, bone histomorphometry.

5.3 Introdução

A remodelação óssea é um processo normal e altamente regulado, que envolve a ação coordenada das células ósseas, e assegura a integridade do esqueleto ao longo da vida (CARDA et al., 2005). Mediadores endócrinos e imunológicos estão envolvidos na regulação da remodelação (SHEA e MILLER, 2005). A osteoporose é uma enfermidade de alta prevalência (CAPPER e FLANAGAN, 2005), cuja patogenia envolve o desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (WHO, 2003). O estabelecimento da doença é multifatorial, porém a exposição crônica do indivíduo a glicocorticoides é uma causa comum (SAMBROOK e LANE, 2001). O glicocorticoide endógeno tem papel central na resposta do organismo ao estresse (DE KLOET et al., 1998; PACAK e MCCARTY, 2000). Dentre os diversos modelos animais para a pesquisa do estresse, o modelo de estresse moderado crônico é amplamente utilizado com o objetivo de induzir alterações compatíveis com a depressão (GAMARO et al., 2003; DALLA et al., 2005; BAKER et al., 2006; DETANICO et al., 2009; LUCCA et al., 2009), que, em humanos, tem sido relacionada à diminuição da densidade mineral óssea (DMO), aumentando o risco do desenvolvimento da osteoporose (CIZZA et al., 2009). O estresse moderado crônico é um modelo que propõe a aplicação de vários tipos de estressores moderados por um período maior de tempo (WILLNER, 1997). Não só o glicocorticoide produzido na resposta ao estresse pode ter efeito sobre o metabolismo ósseo – a norepinefrina também parece desempenhar um importante papel (YIRMIYA et al., 2006). A maioria dos trabalhos que utilizam o estresse moderado crônico tem como objetivo as alterações relativas à depressão, principalmente no que diz respeito ao sistema nervoso central. A relação entre estresse e metabolismo ósseo ainda é muito pouco estudada. Para contribuir com informações adicionais sobre esta relação, o objetivo do presente trabalho é pesquisar o efeito de um protocolo de estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos machos e fêmeas.

5.4 Metodologia

5.4.1 Animais

Os procedimentos adotados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Processo 52/2009), com base na legislação vigente. Vinte ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de ambos os sexos foram adquiridos do Biotério Central da UFV aos três meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) em sala climatizada com ciclos de 12 horas de luz/escuro. Ao completarem cinco meses de idade, deu-se início à aplicação do protocolo de estresse crônico para cinco machos e cinco fêmeas. Os animais restantes compuseram o grupo controle, que não foi submetido a qualquer procedimento durante o experimento.

5.4.2 Estresse Crônico

O protocolo de aplicação de estresse utilizado neste experimento foi baseado em diversas fontes encontradas na literatura científica para o modelo de estresse moderado crônico (GAMARO et al., 2003; DALLA et al., 2005; BAKER et al., 2006; DETANICO et al., 2009; LUCCA et al., 2009). Foram feitas adaptações de acordo com a estrutura disponível em nosso laboratório, resultando num esquema de aplicação de oito fatores estressores, durante 28 dias conforme mostrado na Tabela 5.1. Brevemente, o frio foi aplicado transferindo-se os animais para gaiolas sem maravalha dispostas sobre sacos de gelo. Para a aplicação do calor, as gaiolas eram colocadas dentro de uma grande caixa de papelão, apenas para isolamento térmico parcial, e, com um aquecedor elétrico, a temperatura no sistema era mantida entre 38 e 40°C. Na inclinação, as gaiolas eram apoiadas formando um ângulo de 45° com o chão. Para a imobilização, foram confeccionadas peças de pano, nas quais os animais eram envolvidos e presos por fita com velcro; uma tela permitia a respiração do animal. Às 19h, quando eram apagadas as luzes, os animais submetidos à iluminação noturna eram transferidos para outra sala e

retornados para a sala principal às 7h da manhã do dia seguinte. No 29º dia do experimento, os animais foram pesados, eutanasiados e tiveram fêmures, tíbias e vértebras lombares coletados e dissecados.

Tabela 5.1 Esquema de aplicação do estresse crônico durante 28 dias. A tabela indica o dia, o horário de início e a duração de cada estressor.

Dias	Estressor	Hora Início	Duração
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	

5.4.3 Parâmetros de Avaliação Óssea e Análises Estatísticas

Fêmur e tíbia direitos e o corpo da vértebra L4 foram submetidos a análise densitométrica, obtendo-se os valores de CMO (em gramas), área (cm²) e DMO (g/cm²). Para o teste mecânico, o fêmur esquerdo foi submetido aos ensaios de flexão da cabeça e da diáfise, avaliando-se para cada um a força máxima (em N) suportada pelo osso, a rigidez (em N/mm) e a tenacidade. Medidas histomorfométricas também foram aferidas. Da cabeça do fêmur e do corpo da vértebra foi mensurado o volume trabecular ósseo (BV/TV, em %). A diáfise femoral forneceu ainda medidas histomorfométricas, relacionadas segundo Parfitt et al. (1987): diâmetro médio total e da cavidade medular (B.Dm e Ma.Dm, em µm), espessura do osso cortical (Ct.Wi, µm), perímetro total e da cavidade medular (B.Pm e Ma.Pm, µm), área total e da cavidade medular (B.Ar e Ma.Ar, em µm²). A partir destes dados foram calculadas as relações entre osso cortical e cavidade medular Ct.Wi/Ma.Dm e Ct.Ar/Ma.Ar.

Foram determinados os efeitos do sexo e do estresse, bem como da interação destes fatores, sobre o peso e os parâmetros ósseos submetendo os dados a uma análise de variância do tipo *2-way*. Em caso de efeito significativo, foi empregado o teste de Holm-Sidak como teste post-hoc. A relação entre as observações foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5% para todas as análises, ou como especificado na descrição dos resultados.

5.5 Resultados

5.5.1 Pesos

Após 28 dias, os animais submetidos ao protocolo de estresse mostraram uma diminuição do peso corporal em relação ao início do experimento. As médias dos grupos controle aumentaram no período, mas foram significativas apenas nas fêmeas (Figura 5.1). A correlação entre os pesos inicial e final dos animais foi da ordem de 0,934.

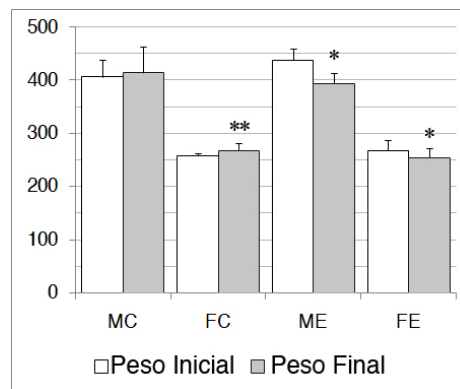


Figura 5.1 Variação do peso corporal, em gramas (g), entre o peso inicial e o peso final dos animais. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Diferença significativa no teste t pareado: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$.

5.5.2 Densitometria

CMO femoral mostrou sofrer efeito do sexo ($p < 0,001$), mas não do estresse ou da interação entre sexo e estresse. O teste de Holm-Sidak evidenciou a diferença entre os sexos (Figura 5.2 A), com os maiores valores entre os machos. Já o CMO da tíbia revelou efeito de interação entre sexo e estresse ($p = 0,006$). O teste *post-hoc* mostrou que o conteúdo mineral ósseo foi maior nos machos submetidos ao estresse, enquanto esse efeito não foi percebido nas fêmeas (Figura 5.2 B). O corpo vertebral não exibiu quaisquer diferenças significativas entre os grupos quanto ao seu conteúdo mineral (Figura 5.2 C).

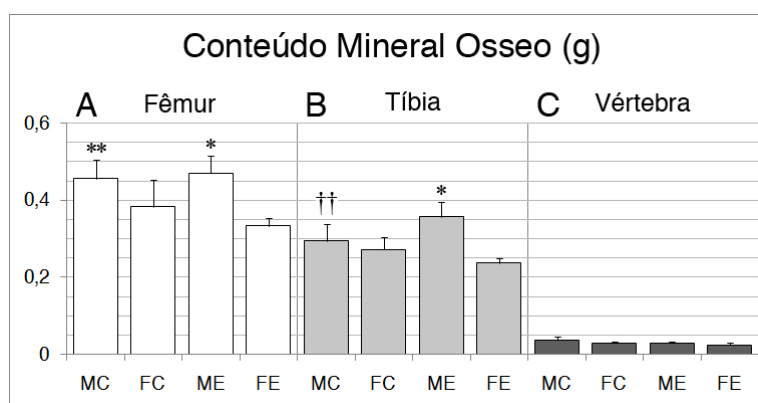


Figura 5.2 Variação do conteúdo mineral ósseo, em gramas (g), do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

As áreas do fêmur e do corpo vertebral mostraram diferença apenas relacionada ao sexo ($p < 0,001$ e $p = 0,046$, respectivamente). Já a área da tíbia revelou uma interação entre o estresse e o sexo ($p = 0,010$), semelhante ao que foi apresentado para CMO tibial. No teste *post-hoc*, a diferença entre machos e fêmeas mostrou-se evidente no fêmur, porém, uma divergência entre os grupos de machos controle e de machos submetidos a estresse também foi verificada (Figura 5.3 A). A tíbia apresentou comportamento semelhante (Figura 5.3 B), enquanto nenhuma diferença foi detectada no corpo vertebral (Figura 5.3 C).

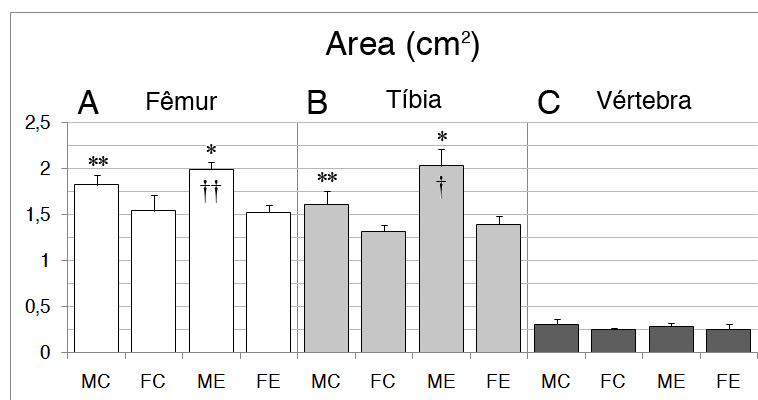


Figura 5.3 Variação da área, em cm^2 , do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

As DMOs da tíbia e do corpo vertebral foram afetadas pelo estresse ($p=0,016$ e $p=0,032$, respectivamente), com médias mais baixas nos grupos submetidos ao estresse. O valor de p para o efeito do estresse sobre DMO femoral foi de $0,050$, e, por isso, não foi submetido ao teste *post-hoc*. Entretanto, a tendência deste efeito pode ser visualizada no gráfico (Figura 5.4 A). O teste de Holm-Sidak evidenciou a diferença entre os sexos dentro dos grupos controle, bem como o efeito do estresse entre as fêmeas da DMO da tíbia (Figura 5.4 B). O teste *post-hoc*, no caso do corpo vertebral, identificou apenas o efeito do estresse nas fêmeas (Figura 5.4 C).

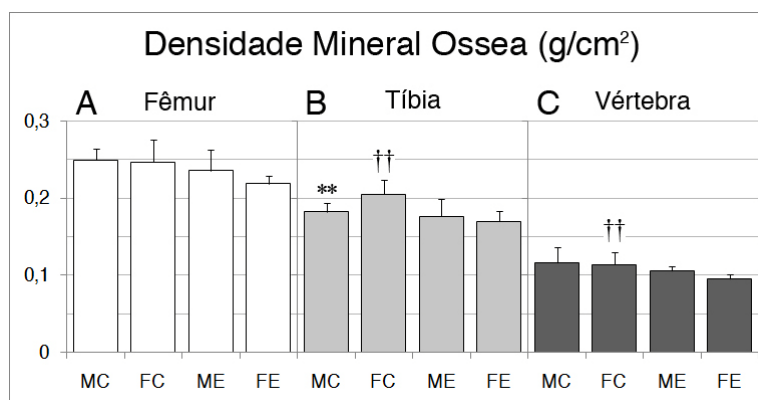


Figura 5.4 Variação da densidade mineral óssea, em g/cm^2 , do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

DMO de qualquer dos ossos avaliados não apresentou correlação com o peso dos animais. Entretanto, o CMO (0,857) e área do fêmur (0,826), bem como CMO (0,709) e área da tíbia (0,697), apresentaram correlação válida com o peso final.

5.5.3 Histomorfometria

As áreas total (B.Ar), da cavidade medular (Ma.Ar) e do osso cortical (Ct.Ar) da seção transversal do fêmur, aferida na análise histomorfométrica apresentou apenas efeito do sexo ($p < 0,001$, para as três medidas). O teste *post-hoc* revelou resultado semelhante entre as medidas, evidenciando médias maiores entre os machos em relação às fêmeas (Figura 5.5).

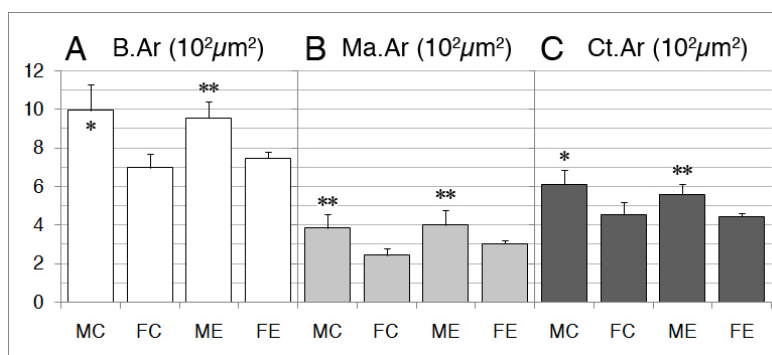


Figura 5.5 Variação da área total (A), da cavidade medular (B) e do osso cortical (C) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm^2 , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A análise de variância mostrou que tanto o diâmetro total quanto o diâmetro da cavidade medular sofrem efeito apenas do sexo ($p < 0,001$, para ambas as medidas). O teste *post-hoc* evidenciou que as médias dos machos são maiores que as apresentadas pelas fêmeas (Figura 5.6 A e B). Já a espessura do osso cortical mostrou não apenas efeito do sexo ($p = 0,033$), como também do estresse ($p = 0,49$). Embora o teste de Holm-Sidak não tenha sido capaz de evidenciar as diferenças, a análise do gráfico indica que o estresse é capaz de diminuir ligeiramente as medidas da espessura do osso cortical (Figura 5.6 C).

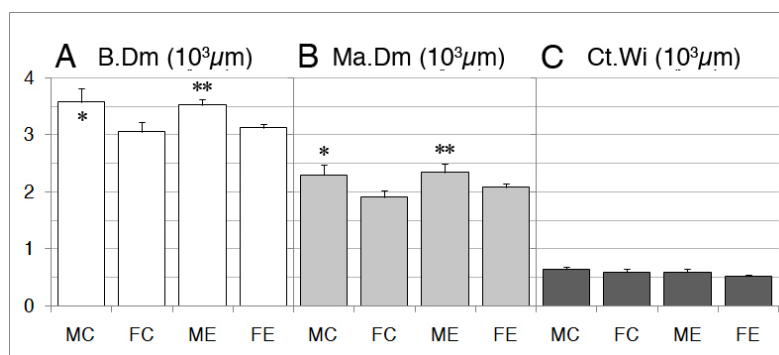


Figura 5.6 Variação dos diâmetros total (A) e da cavidade medular (B) e da espessura do osso cortical (C) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Apenas o sexo teve influência nos perímetros total e da cavidade medular ($p < 0,001$ para ambas as medidas). O teste *post-hoc* evidencia as diferenças entre machos e fêmeas (Figura 5.7 A e B).

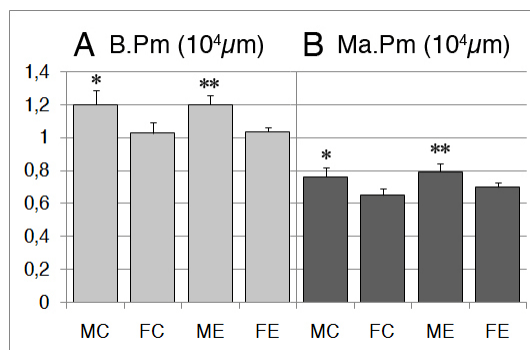


Figura 5.7 Variação do perímetro total (A) e da cavidade medular (B) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A correlação entre o peso dos animais e os parâmetros de avaliação da seção transversal é alta (variando entre 0,773 e 0,939), com exceção das relações osso cortical/cavidade medular, que não apresentaram correlação, e Ct.Wi, cujo coeficiente de correlação foi de 0,594.

O estresse foi capaz de alterar a relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro do canal medular ($p=0,023$). Tal relação diminuiu nos animais submetidos ao protocolo de estresse, principalmente nas fêmeas. O teste de Holm-Sidak foi capaz de demonstrar o efeito do estresse apenas nas fêmeas (Figura 5.8 A). O mesmo aconteceu na relação entre as áreas, que diminuiu com o estresse ($p=0,036$). O teste *post-hoc* também mostrou apenas a diferença entre as fêmeas (Figura 5.8 B).

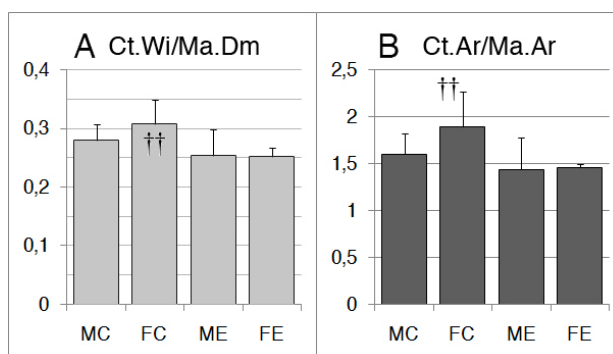


Figura 5.8 Variação da relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular (A) e entre a área do osso cortical e a área da cavidade medular (B) do corte transversal da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

Na cabeça do fêmur, estresse e sexo apresentaram efeito sobre o volume trabecular ósseo, com valores de p iguais a 0,018 e 0,005, respectivamente. O teste *post-hoc* verificou diferenças entre os grupos de machos e fêmeas controle e entre os grupos de machos controle e submetidos a estresse (Figura 5.9 A). Já no corpo da vértebra, as duas variáveis independentes não afetaram o volume trabecular ósseo (Figura 5.9 B).

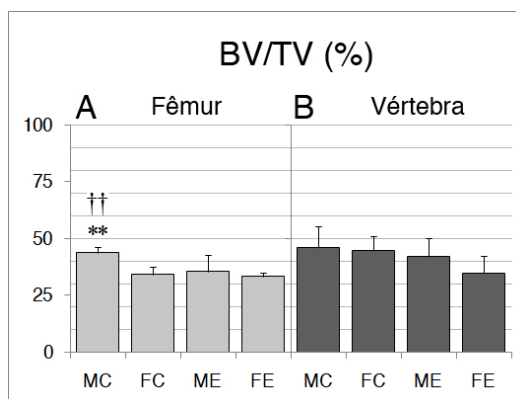


Figura 5.9 Variação do volume trabecular ósseo (BV/TV) na cabeça do fêmur (A) e no corpo vertebral (B), em %, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

O BV/TV do fêmur apresentou ainda um coeficiente de correlação de 0,566 com o peso do animal.

5.5.4 Teste Mecânico

O efeito do sexo mostrou-se presente na força máxima atingida no teste de flexão tanto da cabeça quanto da diáfise do fêmur ($p=0,002$ e $p=0,007$). Entretanto, o estresse afetou apenas o primeiro dos dois testes ($p=0,035$), em que as médias mostraram-se maiores nos grupos controle. O teste de Holm-Sidak evidenciou as diferenças entre os sexos dos grupos controle e entre os tratamentos dos grupos de animais machos (Figura 5.10 A), quando se considera a flexão da cabeça do fêmur. Para a diáfise, apenas a diferença entre machos e fêmeas submetidos ao estresse pôde ser notada no teste *post-hoc* (Figura 5.10 B).

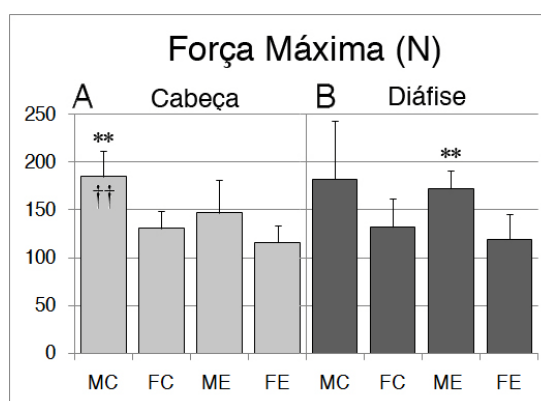


Figura 5.10 Variação da força máxima suportada, em N, no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

A rigidez da cabeça do fêmur mostrou sofrer interação entre o estresse e o sexo do animal na análise de variância ($p=0,021$). Segundo o teste de Holm-Sidak, apenas diferença entre machos e fêmeas nos grupos submetidos ao estresse pôde ser notada (Figura 5.11 A). A análise do gráfico revela um comportamento inverso das médias obtidas. Os machos submetidos ao estresse mostram médias maiores que seu grupo controle, enquanto nas fêmeas ocorre o contrário. Já a rigidez da diáfise fêmur mostrou apenas o efeito do sexo ($p=0,028$). O teste *post-hoc* não identificou qualquer diferença entre os grupos, porém, a análise do gráfico revela médias inferiores nas fêmeas (Figura 5.11 B).

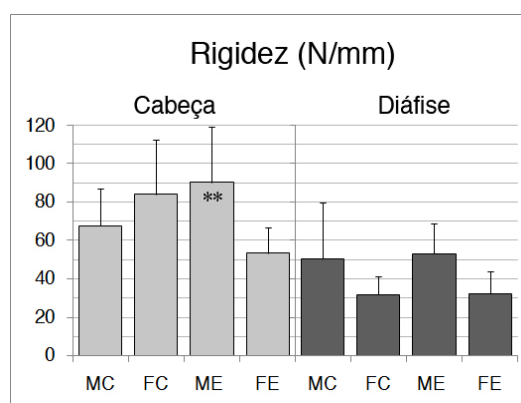


Figura 5.11 Variação da rigidez, em N/mm, apresentada no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

A tenacidade da cabeça do fêmur não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 5.12 A). Já a tenacidade da diáfise do fêmur mostrou efeitos isolados do estresse ($p=0,036$) e do sexo ($p=0,004$). A análise *post-hoc* identificou apenas a diferença entre sexos no grupo controle (Figura 5.12 B).

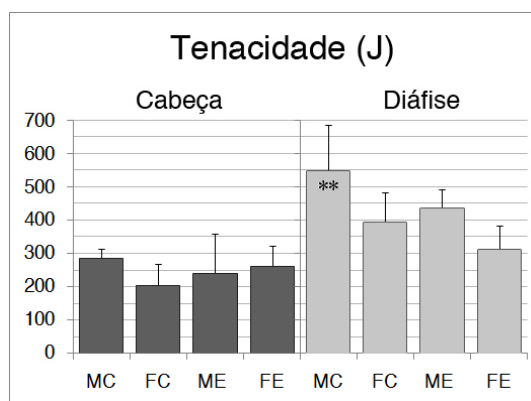


Figura 5.12 Variação da tenacidade, em J, apresentada no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

BV/TV do fêmur mostrou um coeficiente de correlação de 0,537 com a força máxima e de 0,492 com a tenacidade da cabeça do fêmur no teste de flexão.

5.6 Discussão

Os principais trabalhos disponíveis que utilizam o estresse moderado crônico estudam alterações comportamentais ou bioquímicas que envolvem o sistema nervoso. Este tipo de alteração não faz parte dos objetivos deste estudo. O estresse utilizado conforme o protocolo deste trabalho foi capaz de provocar a perda de peso corporal tanto em machos quanto em fêmeas. Os ratos podem aumentar o peso até cerca de 18 meses de idade (SENGUPTA et al., 2005); por isso, muitos autores referem-se ao efeito causado pelo estresse moderado crônico como diminuição do ganho de peso corporal, pois utilizam animais jovens (MARIN et al., 2007; GARCIA et al., 2009; GONG et al., 2011). Entretanto, a perda de peso ou a diminuição na taxa de ganho de peso não são observadas por todos os pesquisadores (BEKRIS et al., 2005).

Embora machos naturalmente acumulem mais peso que as fêmeas, neste trabalho, as fêmeas do grupo controle ganharam peso durante o período estudado, enquanto os machos não apresentaram alteração entre o peso inicial e o final. Já os grupos submetidos ao protocolo de estresse mostraram peso final menor que o inicial. Entretanto, não houve dimorfismo sexual na resposta do peso ao estresse, ao contrário dos resultados apresentados por García-Cáceres et al. (2010), em que a resposta do ganho de peso dos ratos ao estresse quando adultos mostrou-se sexualmente dimórfica, mas aparentemente sem relação com hormônios sexuais.

Harris et al. (2006), utilizando apenas a imobilização como estressor crônico em ratos, observaram que a perda inicial de peso corporal está relacionada à diminuição do consumo de alimento e ao aumento do gasto de energia, lembrando que a anorexia também pode ser um sintoma da depressão. O protocolo esquematizado para o presente trabalho utilizou gaiolas coletivas e os animais foram submetidos a muita manipulação nas mudanças de gaiola para a aplicação dos estressores. O isolamento, por exemplo, empregou outro sistema de alimentação. Por isso, não foi possível mensurar de forma precisa a quantidade de alimento ingerida pelos animais ao longo do experimento. Os dados coletados apresentaram grande variação aleatória entre as observações, impossibilitando uma análise confiável, o que não significa que não possa ter havido alteração na alimentação dos animais (dados não apresentados). Os efeitos do estresse sobre a alimentação e o peso podem depender do ritmo circadiano (HARRIS et al., 2002).

O protocolo de estresse empregado neste experimento foi capaz de causar alterações nos parâmetros ósseos avaliados. Além de reduzir a DMO, houve indícios de que o estresse possa atuar no osso cortical da diáfise do fêmur. Embora não se possa afirmar que a perda óssea verificada no modelo de estresse moderado crônico seja causada pelo glicocorticoide (YIRMIYA et al., 2006), sua ação é ainda muito provável, pois eles podem exercer impacto no osso de muitas maneiras, desde prejudicando a absorção de cálcio no intestino até inibindo a função osteoblástica (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000; LAFAGE-PROUST et al., 2003). A característica cardinal da osteoporose induzida por glicocorticoides é a diminuição da formação óssea (MCILWAIN, 2003; TAMURA et al., 2004), afetando diretamente os osteoblastos tanto na sua capacidade proliferativa quanto metabólica (PATSCHAND et al., 2001), além de induzir sua apoptose (LAFAGE-PROUST et al., 2003). Os glicocorticoides também diminuem a absorção de cálcio no intestino e a reabsorção renal do cálcio filtrado no glomérulo (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000). O estresse pode afetar a produção de hormônios sexuais (EPEL, 2008), que possuem importante papel na manutenção óssea (RIGGS et al., 2002). Entretanto, o efeito do estresse sobre esses hormônios nos modelos animais é contraditório (TSUCHIYA e HORII, 1995; RETANA-MÁRQUEZ, 2003; CHICHINADZE e CHICHINADZE, 2008). O principal efeito do estresse moderado crônico nas fêmeas é a irregularidade que provoca nos ciclos estrais (DALLA *et al.*, 2005). A variação desses dados na literatura pode ocorrer não apenas pela variedade de protocolos utilizados, mas também do dimorfismo sexual relacionado a cada tipo de estressor. Em humanos, por exemplo, os homens apresentam resposta mais acentuada quando o fator estressor envolve realização ou conquista e as mulheres, maior quando envolve rejeição social (STROUD et al., 2002). Segundo Willner (1997), o modelo de estresse moderado crônico é de difícil estabelecimento, além de ser trabalhoso e demandar muito espaço e tempo. No entanto, uma vez estabelecido, traz informações preciosas sobre problemas que são extremamente difíceis de estudarem-se por outros meios. É importante lembrar que a resposta a um tipo de estressor depende fundamentalmente da plasticidade fenotípica, determinada pela interação entre o ambiente e o genoma (ANISMAN e MATHESON, 2005; LEVINE, 2005). Mecanismos imunológicos também têm efeito tanto no sistema nervoso quanto no sistema ósseo, porém pouco se sabe sobre a interação entre eles. Segundo Yirmiya et al. (2006), a norepinefrina pode ser a principal responsável pela perda óssea após aplicação do

estresse moderado crônico em camundongos. Entretanto, essa relação necessita de investigação mais profunda.

5.7 Conclusões

O protocolo de estresse moderado crônico utilizado neste trabalho foi capaz de diminuir a densidade mineral óssea, bem como a espessura do osso cortical da seção transversal da diáfise do fêmur, além de diminuir o peso dos animais. Na cabeça do fêmur, o estresse ainda diminuiu a o volume trabecular ósseo e a força máxima atingida no teste de flexão. O efeito do sexo apareceu em quase todos os parâmetros, em que as médias exibidas pelos machos foram menores que as fêmeas. Com isso, confirma-se que o estresse pode comprometer o equilíbrio da homeostase óssea, colaborando para o estabelecimento da osteopenia ou osteoporose.

5.8 Referências bibliográficas

ANISMAN, H.; MATHESON, K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.525-546, 2005.

BAKER, S. L.; KENTNER, A. C.; KONKLE, A. T.M.; BARBAGALLO, L. S.-M.; BIELAJEW, C. Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats. **Physiology & Behavior**, v.87, p.314-322, 2006.

BEKRIS, S.; ANTONIOU, K.; DASKAS, S.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI; Z. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behavioural Brain Research**, v.161, p.45-59, 2005.

CAPPER, C.; FLANAGAN, M. OPTIONS: Osteoporosis Prevention in UK Schools. **Journal of Orthopaedic Nursing**, v.9, p.39-42, 2005.

CARDA, C.; SILVESTRINI, G.; DE FERRARIS, M. E. G.; PEYDRÓ, A.; BONUCCI, E. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL Expression and Distribution in Developing Human Craniomandibular Joint. **Tissue and Cell**, v. 37, p. 247-255. 2005.

CHICHINADZE, K.; CHICHINADZE, N. Stress-induced increase of testosterone: Contributions of social status and sympathetic reactivity. **Physiology & Behavior**, v.94, p.595-603, 2008.

CIZZA, G.; RAVN, P.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Depression: A major, unrecognized risk factor for osteoporosis? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, n.5, p.198-203, 2001.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; DROSSOPOULOU, G.; SAGORARIS, M.; KOKRAS, N.; SFIKAKIS, A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? **Neuroscience**, v.135, n.3, p.703-714, 2005.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOËL, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews**, v.19, p.269-301, 1998.

DETANICO, B. C.; PIATO, A. L.; FREITAS, J. J.; LHULLIER, F. L.; HIDALGO, M. P.; CAUMO, W.; ELISABETSKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. **European Journal of Pharmacology**, v.607, v.1-3, p.121-125, 2009.

EPEL, E. S. Psychological and metabolic stress: A recipe for accelerated cellular aging? **Hormones**, v.8, n.1, p.7-22, 2009.

GAMARO, G. D.; MANOLI, L. P.; TORRES, I. L. S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v.42, p.107-114, 2003.

GARCIA, L. S. B.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, p.450-455, 2009.

GARCÍA-CÁCERES, C.; DIZ-CHAVES, Y.; LAGUNAS, N.; CALMARZA-FONT, IS.; AZOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L. M.; FRAGO, L. M.; ARGENTE, J. CHOWEN, J. A. The weight gain response to stress during adulthood is conditioned by both sex and prenatal stress exposure. **Psychoneuroendocrinology**, v.35, p.403-413, 2010.

HARRIS, R. B. S.; PALMONDON, J.; LESHIN, S.; FLATT, W. P.; RICHARD, D. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. **Hormones and Behavior**, v.49, p.615-625, 2006.

HARRIS, R. B. S.; ZHOU, J.; MITCHELL, T.; HEBERT, S.; RYAN, D. H. Rats fed only during the light period are resistant to stress-induced weight loss. **Physiology & Behavior**, v.76, p.543-550, 2002.

LAFAGE-PROUST, M. H.; BOUDIGNON, B.; THOMAS, T. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathophysiology Data and Recent Treatments. **Joint Bone Spine**, n. 70, v. 109-118. 2003.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International**, v.54, p.358-362, 2009.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, p.79–85. 2000.

MCILWAIN, H. H. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **Preventive Medicine**, v.36, p.243-249. 2003.

PACAK, K.; McCARTY, R. Acute Stress response: Experimental. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, 2000, v.2, p.7-14.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUS, F. H. ; KANIS, J. A. ; MALLUCHE, H. ; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M. ; RECKER, R. R. Bone Histomorphometry : Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.2, n.6, p.595-610, 1987.

PATSCHAND, D; LODDENKEMPER, K; BUTTGEREIT, F. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Bone**, v. 29, p. 498-505. 2001.

RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA, R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. **Hormones and Behavior**, v.44, p.327-337, 2003.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex Steroids and the Construction and conservation of the Adult Skeleton. **Endocrine Reviews**, v.23, n.3, p. 279-302. 2002.

SAMBROOK, P; LANE, N E. Corticosteroid Osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.15, p.401-413. 2001.

SENGUPTA, S.; ARSHAD, M.; SHARMA, S.; DUBEY, M.; SINGH, M. M. Attainment of peak bone mass and bone turnover rate in relation to estrous cycle, pregnancy and lactation in colony-bred Sprague-Dawley rats: Suitability for studies on pathophysiology of bone and therapeutic measures for its management. **Journal of Steroids Biochemistry & Molecular Biology**, v.94, p.421-429, 2005.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal Function and Structure: Implications for Tissue-Target Therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.945-957. 2005.

STROUD, L. R.; SALOVEY, P.; EPEL, E. S. Sex differences in stress responses: Social rejection versus achievement stress. **Biol Psychiatry**, v.52, p.318-327, 2002.

TAMURA, Y.; OKINAGA, H.; TAKAMI, H. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p.500-504. 2004.

TSUCHIYA, T.; HORII, I. Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male syrian hamsters. **Psychoneuroendocrinology**, v.20, n.1, p.95-102, 1995.

WILNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v.134, p.319-329, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis. WHO Technical Report Series, v. 921, 193p. 2003.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I.; BAJAYO, A.; KREISEL, T.; FELDMAN, S.; TAM, J.; TREMBOVIER, V.; CSERNUS, V.; SHOHAMI, E.; BAB, I. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.45, p.16876-16881, 2006.

ZIEGLER, R; KASPERK, C. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Prevention and Treatment. **Steroids**, v.63, p.344-348. 1998.

6 CAPÍTULO V

EFEITO DO ESTRESSE MODERADO CRÔNICO SOBRE PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO ÓSSEA EM RATOS SENIS

6.1 Resumo

A osteoporose é uma doença comum entre os idosos e, embora seja multifatorial, muitos processos inerentes ao envelhecimento contribuem com sua patogenia. O estresse crônico é capaz de comprometer a massa óssea e, assim como a osteoporose, é considerado um importante fator que compromete a qualidade de vida dos idosos. O presente trabalho busca avaliar o efeito de um protocolo de estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos de 22 a 24 meses de idade. Para isso, cinco animais de cada sexo foram submetidos a um protocolo de aplicação de estressores moderados durante 28 dias. Foram incluídos frio, calor, imobilização, inclinação da gaiola, isolamento, luz noturna e privação de água e de ração, como estressores. Como grupo controle, cinco animais de cada sexo foram mantidos em gaiola duas gaiolas coletivas, com água e ração à vontade, sem qualquer outro tipo de intervenção. Os animais foram pesados no início e no final do período, e, após eutanásia, tiveram seus ossos coletados. Fêmur, tíbia e vértebra lombar foram submetidos a densitometria óssea. Foram realizados ainda testes biomecânicos de flexão da cabeça e da diáfise do fêmur. Em análise histomorfométrica foram obtidos os volumes trabeculares da cabeça do fêmur e do corpo vertebral e medidas do osso cortical e da cavidade medular da seção transversal do fêmur. O protocolo estimulou a perda de peso corporal dos animais e diminuiu a densidade mineral, o volume trabecular e a tenacidade da diáfise do fêmur. Os animais senis mostraram-se menos sensíveis à perda de massa óssea induzida pelo estresse que ratos mais jovens avaliados em análise anterior utilizando as mesmas condições apresentadas neste trabalho, sugerindo que o envelhecimento pode retardar a resposta do tecido ósseo aos estímulos desencadeados pelo estresse.

Palavras-chave: osteoporose, envelhecimento, estresse moderado crônico.

6.2 Abstract

EFFECT OF CHRONIC MILD STRESS ON BONE PARAMETERS OF AGED RATS

Osteoporosis is a common disease among the elderly and, although it has multifactorial nature, many processes associated with aging contribute to its pathogenesis. Chronic stress can impair bone mass and it is considered an important factor that affects the welfare of our seniors, as does osteoporosis. This study aims to evaluate the effect of a chronic mild stress protocol on bone parameters of 22-24 months old rats. To do that, male and female rats were subjected to a moderate stress protocol application during 28 days. We included cold, heat, immobilization, tilt cage, isolation, deprivation of water and food, and night light, as stressors. Right femur, right tibia and L4 vertebrae were analyzed by densitometry, providing bone mineral content, bone area and bone mineral density. Left femur was subjected to biomechanical bending on its head and diaphysis, providing maximum strength, stiffness and toughness. Right femur and L5 vertebra were also submitted to histomorphometric analysis to obtain means for bone trabecular volume in femoral head and vertebral body, and measures of cortical bone and marrow cavity in femoral diaphysis cross-section. The protocol reduced body weight and decreased femoral mineral density, trabecular volume of the head and toughness of the diaphysis. Aged rats were less susceptible to stress-induced bone loss than younger rats evaluated in previous analysis that employed the same conditions presented here. The results suggest that aging may slow bone tissue response to stimuli caused by stress.

Keywords: osteoporosis, aging, chronic moderate stress, animal model, rats.

6.3 Introdução

O envelhecimento relaciona-se com o declínio progressivo das funções fisiológicas com o avanço do tempo (AUSTAD, 2005). Uma das doenças que mais compromete a qualidade de vida dos idosos é a osteoporose, caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido, tornando os ossos mais frágeis e, portanto, mais susceptíveis a fratura (WHO, 2003). Nas mulheres, a principal causa da osteoporose é a deficiência de estrógeno (FAN et al., 2005). Entretanto, a doença tem caráter multifatorial e tem grande importância em ambos os sexos (GALI, 2001). Mecanismos diretamente relacionados ao envelhecimento como disfunções na absorção intestinal de cálcio também competem para o desequilíbrio no metabolismo ósseo (LICATA, 2003). O estresse é um fator que pode causar grande impacto sobre a esperança e a qualidade de vida dos idosos. Estresse e envelhecimento compartilham de alguns mecanismos comuns, em que processos oxidativos destacam-se como ponto central (PARDON, 2007). Em modelo animal, o estresse ao longo da vida pode prejudicar a função cognitiva na velhice (SANDI e TOUYAROT, 2006). Além disso, em ambos os sexos, níveis séricos de cortisol aumentam com a idade (BUCKINGHAM, 2000) e tal aumento, por si só, é capaz de prejudicar o metabolismo ósseo (WEINSTEIN et al., 2010). O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos de um protocolo de estresse moderado crônico sobre parâmetros de avaliação óssea em ratos senis de ambos os sexos.

6.4 Metodologia

6.4.1 Animais

As práticas adotadas neste experimento foram aprovadas pelo Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Processo 52/2009), com base na legislação vigente. Vinte ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de ambos os sexos com idades entre 22 e 24 meses, foram utilizados no experimento. Os animais faziam parte do grupo de matrizes de reprodução do Biotério Central da UFV e seriam descartados por volta dos 12 meses de idade, quando foram adquiridos para o presente trabalho. Por um ano, eles foram mantidos em sala climatizada, recebendo apenas água e ração comercial, até que atingissem a idade desejada para o estudo. Durante este período, um macho e uma fêmea vieram a óbito. Cinco machos e 5 fêmeas foram submetidos ao protocolo de estresse crônico. O grupo controle, com 4 animais de cada sexo, não foi submetido a qualquer procedimento.

6.4.2 Estresse Crônico

O protocolo de aplicação de estresse utilizado neste experimento foi baseado em diversas fontes encontradas na literatura científica para o modelo de estresse moderado crônico (GAMARO et al., 2003; DALLA et al., 2005; BAKER et al., 2006; DETANICO et al., 2009; LUCCA et al., 2009). Foram feitas adaptações de acordo com a estrutura disponível em nosso laboratório, resultando num esquema de aplicação de oito fatores estressores, durante 28 dias conforme mostrado na Tabela 6.1. Brevemente, o frio foi aplicado transferindo-se os animais para gaiolas sem maravalha dispostas sobre sacos de gelo. Para a aplicação do calor, as gaiolas eram colocadas dentro de uma grande caixa de papelão, apenas para isolamento térmico parcial, e, com um aquecedor elétrico, a temperatura no sistema era mantida entre 38 e 40°C. Na inclinação, as gaiolas eram apoiadas formando um ângulo de 45° com o chão. Para a imobilização, foram confeccionadas peças de pano, nas quais os animais eram envolvidos e presos por fita

com velcro; uma tela permitia a respiração do animal. Às 19h, quando eram apagadas as luzes, os animais submetidos à iluminação noturna eram transferidos para outra sala e retornados para a sala principal às 7h da manhã do dia seguinte. No 29º dia do experimento, os animais foram pesados, eutanasiados e tiveram fêmures, tíbias e vértebras lombares coletados e dissecados.

Tabela 6.1 Esquema de aplicação do estresse crônico durante 28 dias. A tabela indica o dia, o horário de início e a duração de cada estressor.

Dias	Estressor	Hora Início	Duração
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	

6.4.3 Parâmetros de Avaliação Óssea e Análises Estatísticas

Fêmur e tíbia direitos e o corpo da vértebra L4 foram submetidos a análise densitométrica, obtendo-se os valores de CMO (em gramas), área (cm²) e DMO (g/cm²). Para o teste mecânico, o fêmur esquerdo foi submetido aos ensaios de flexão da cabeça e da diáfise, avaliando-se para cada um a força máxima (em N) suportada pelo osso, a rigidez (em N/mm) e a tenacidade. Medidas histomorfométricas também foram aferidas. Da cabeça do fêmur e do corpo da vértebra foi mensurado o volume trabecular ósseo (BV/TV, em %). A diáfise femoral forneceu ainda medidas histomorfométricas, relacionadas segundo Parfitt et al. (1987): diâmetro médio total e da cavidade medular (B.Dm e Ma.Dm, em µm), espessura do osso cortical (Ct.Wi, µm), perímetro total e da cavidade medular (B.Pm e Ma.Pm, µm), área total e da cavidade medular (B.Ar e Ma.Ar, em µm²). A partir destes dados foram calculadas as relações entre osso cortical e cavidade medular Ct.Wi/Ma.Dm e Ct.Ar/Ma.Ar.

6.4.4 Análises Estatísticas

Foram determinados os efeitos do sexo e do estresse, bem como da interação destes fatores, sobre o peso e os parâmetros ósseos submetendo os dados a uma análise de variância do tipo *2-way*. Em caso de efeito significativo, foi empregado o teste de Holm-Sidak como teste post-hoc. A relação entre as observações foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5% para todas as análises, ou como especificado na descrição dos resultados.

6.5 Resultados

6.5.1 Pesos

Os animais submetidos ao estresse apresentaram diminuição do peso corporal entre o início e o final do experimento, enquanto o peso dos animais do grupo controle não variou durante o período (Figura 6.1).

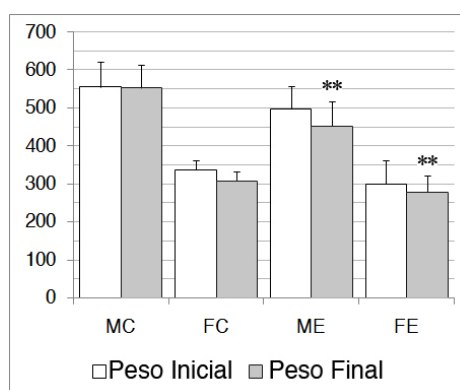


Figura 6.1 Variação do peso corporal, em gramas (g), entre o peso inicial e o peso final dos animais. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Diferença significativa no teste t pareado: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$.

6.5.2 Densitometria

CMO do fêmur e da tíbia apresentaram efeito apenas do sexo ($p < 0,001$, para ambos os ossos). Este resultado foi confirmado no teste *post-hoc* (Figura 6.2 A e B), que mostrou que o conteúdo mineral do fêmur e da tíbia dos machos era maior que o das fêmeas. CMO do corpo da vértebra não apresentou qualquer diferença entre os grupos (Figura 6.2 C).

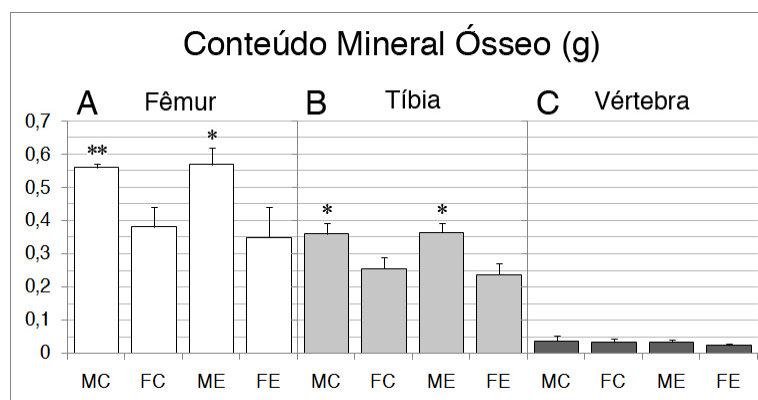


Figura 6.2 Variação do conteúdo mineral ósseo, em gramas (g), do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A área do fêmur, aferida na análise densitométrica revelou sofrer efeito tanto do sexo ($p < 0,001$), quanto do estresse ($p = 0,012$). O teste *post-hoc* identificou a diferença entre os sexos tanto nos animais controle, quanto nos submetidos ao estresse. Por outro lado, o efeito do estresse foi detectado apenas entre as fêmeas (Figura 6.3 A). Já a área da tíbia mostrou apenas o efeito do sexo ($p < 0,001$), diferença confirmada pelo teste de Holm-Sidak (Figura 6.3 B). A área da vértebra, por sua vez, não apresentou diferenças significativas (Figura 6.3 C).

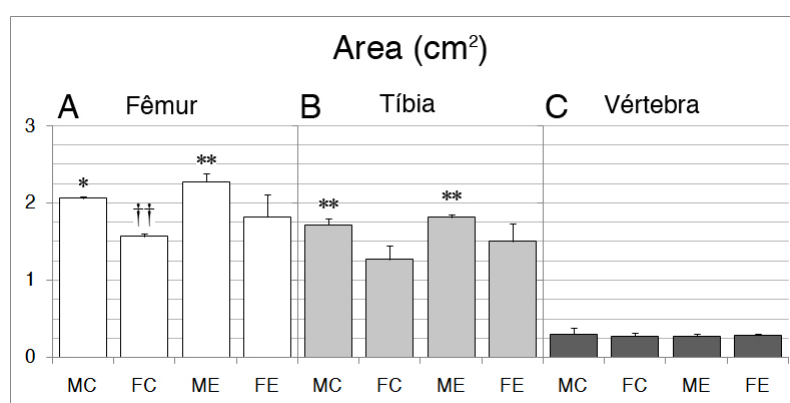


Figura 6.3 Variação da área, em cm^2 , do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Apenas a DMO do fêmur revelou sofrer efeito do estresse ($p=0,007$), bem como do sexo ($p=0,010$). O teste de Holm-Sidak identificou diferença entre machos e fêmeas submetidos ao estresse e entre os dois grupos de fêmeas (Figura 6.4 A), sugerindo que a perda de densidade óssea por causa do estresse pode ser mais expressiva nas fêmeas. Tíbia e corpo vertebral não exibiram efeito significativo do estresse ou do sexo (Figuras 6.4 B e C).

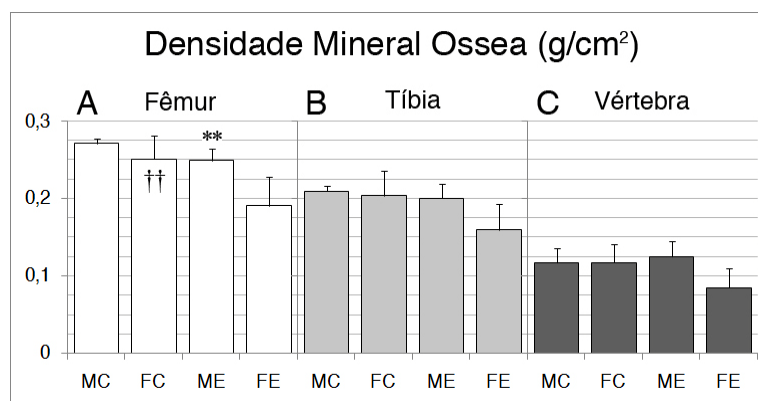


Figura 6.4 Variação da densidade mineral óssea, em g/cm², do fêmur (A), da tíbia (B) e da vértebra (C), segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

O peso corporal mostrou correlação moderada com a DMO do fêmur (0,664), da tíbia (0,511) e da vértebra (0,554). A correlação entre DMO dos três ossos variou de 0,715 a 0,903.

6.5.3 Histomorfometria

A área total da seção transversal da diáfise do fêmur mostrou sofrer efeito apenas do sexo ($p < 0,001$), diferença confirmada no teste *post-hoc* (Figura 6.5 A). A área da cavidade medular não apresentou qualquer efeito do sexo ou do estresse (Figura 6.5 B). Já a área do osso cortical, assim como a total, sofreu efeito apenas do sexo ($p < 0,001$), porém o teste de Holm-Sidak identificou somente a diferença entre machos e fêmeas submetidos ao estresse (Figura 6.5 C).

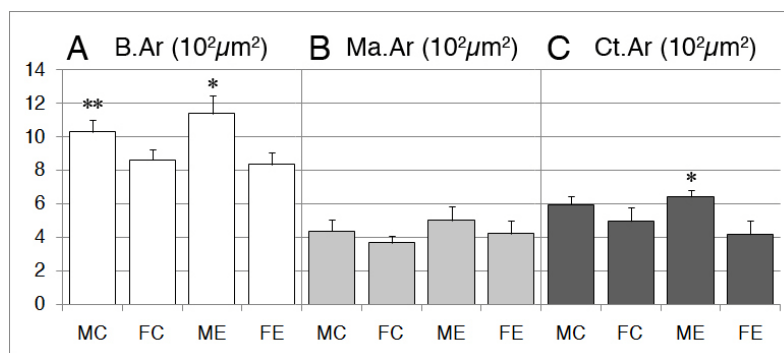


Figura 6.5 Variação da área total (A), da cavidade medular (B) e do osso cortical (C) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm^2 , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Os valores obtidos na mensuração dos perímetros total e da cavidade medular da seção transversal da cavidade do fêmur mostraram, na análise de variância, sofrer efeito apenas do sexo ($p < 0,001$ e $p = 0,046$, respectivamente). Apenas a primeira medida mostrou diferença significativa no teste *post-hoc*, em que as medidas dos machos mostraram-se maiores que das fêmeas (Figuras 6.6 A e B).

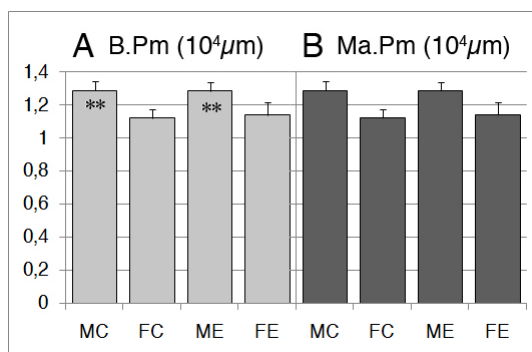


Figura 6.6 Variação do perímetro total (A) e da cavidade medular (B) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MJ: Machos Jovens; MS: Machos Senis; FJ: Fêmeas Jovens; FS: Fêmeas Senis. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Os diâmetros total e da cavidade medular, bem como a medida da espessura do osso cortical também apresentaram apenas efeito do sexo ($p < 0,001$, $p = 0,020$ e $p = 0,028$, respectivamente). O teste de Holm-Sidak mostrou que os machos têm diâmetro total maior que as fêmeas (Figura 6.7 A), mas não detectou as diferenças entre os grupos quanto ao diâmetro da cavidade medular (Figura 6.7 B). Já em relação à espessura do osso cortical, o teste *post-hoc* revelou apenas a diferença entre os sexos nos animais submetidos ao estresse (Figura 6.7 C).

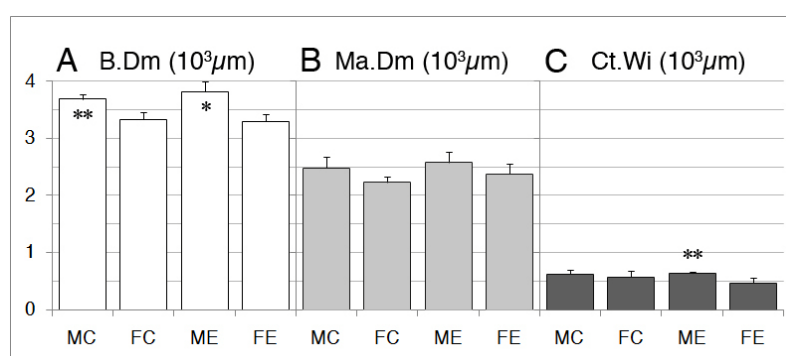


Figura 6.7 Variação dos diâmetros total (A) e da cavidade medular (B) e da espessura do osso cortical (C) do corte transversal da diáfise do fêmur, em μm , segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

As relações entre as medidas histomorfométricas do osso cortical e da cavidade medular aferidas na seção transversal da diáfise do fêmur não apresentaram quaisquer diferenças significativas entre os grupos (Figuras 6.8 A e B).

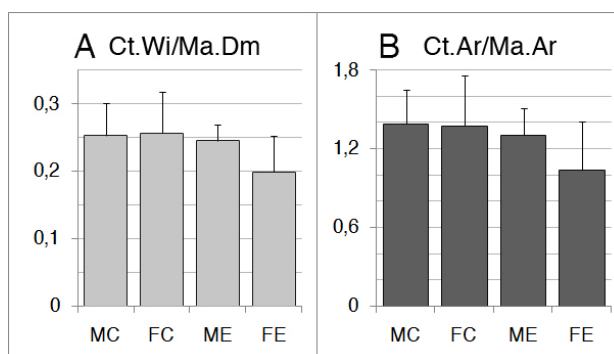


Figura 6.8 Variação da relação entre a espessura do osso cortical e o diâmetro da cavidade medular (A) e entre a área do osso cortical e a área da cavidade medular (B) do corte transversal da diáfise do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

Quanto ao volume trabecular ósseo femoral, embora o efeito do estresse tenha sido identificado na análise de variância ($p=0,004$), uma interação entre estresse e sexo pôde ser verificada ($p=0,040$). O teste *post-hoc* mostrou que as médias apresentadas pelos machos submetidos ao estresse foram menores que do grupo controle. Entretanto, este efeito não foi percebido entre as fêmeas (Figura 6.9 A). O volume trabecular ósseo do corpo da vértebra não apresentou diferenças significativas (Figura 6.9 B).

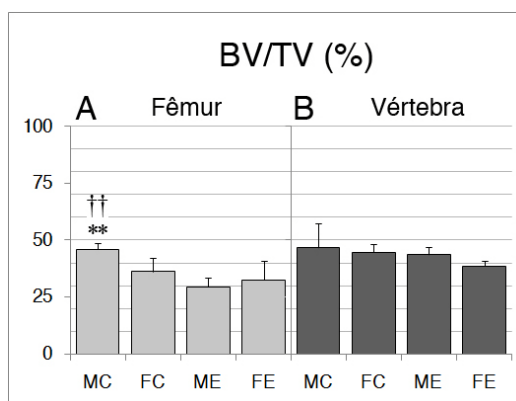


Figura 6.9 Variação do volume trabecular ósseo (BV/TV) na cabeça do fêmur (A) e no corpo vertebral (B), em %, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

O coeficiente de correlação entre BV/TV e DMO do fêmur foi de 0,640. Uma correlação alta foi verificada entre a DMO do fêmur e a espessura (0,866) e a área do osso cortical (0,804).

6.5.4 Teste Biomecânico

A força máxima atingida nos teste de flexão mostrou efeito apenas do sexo ($p=0,004$) na cabeça femoral, diferença confirmada no teste *post-hoc* (Figura 6.10 A). Na flexão da diáfise, nenhuma diferença foi percebida nesta medida (Figura 6.10 B).

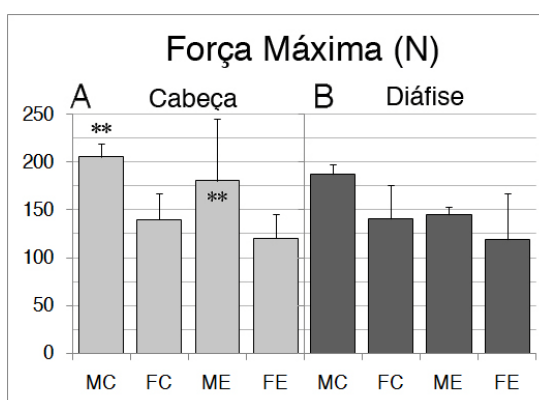


Figura 6.10 Variação da força máxima suportada, em N, no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p<0,001$ e ** $p<0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p<0,001$ e †† $p<0,05$.

A tenacidade da cabeça do fêmur não apresentou alterações significativas (Figura 6.11 A). Em contrapartida a tenacidade da diáfise femoral apresentou efeito isolado das duas variáveis independentes, com valores de p iguais a 0,027 e 0,043, para sexo e estresse, respectivamente. O teste *post-hoc* identificou apenas diferenças entre os sexos nos grupos controle e entre os dois grupos de ratos machos (Figura 6.11 B).

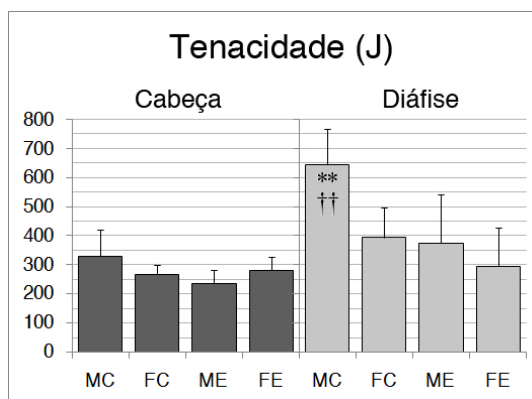


Figura 6.11 Variação da tenacidade, em J, apresentada no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A rigidez aferidas nos testes também não apresentou efeito do sexo, do estresse ou da interação entre os fatores (Figuras 6.12 A e B).

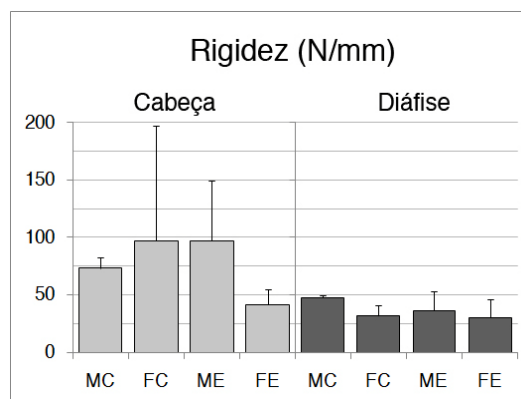


Figura 6.12 Variação da rigidez, em N/mm, apresentada no teste de flexão da cabeça (A) e da diáfise (B) do fêmur, segundo sexo e idade. As barras representam a média e o desvio-padrão dos grupos. MC: Machos Controle; FC: Fêmeas Controle; ME: Machos Estresse; FE: Fêmeas Estresse. Os sinais representam diferenças significativas no teste de Holm-Sidak; entre sexos dentro do mesmo tratamento: * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$; entre tratamentos dentro do mesmo sexo: † $p < 0,001$ e †† $p < 0,05$.

A força máxima atingida na flexão da cabeça do fêmur guarda correlação moderada com B.Ar (0,696), B.Pm (0,626), Ct.Wi (0,575), B.Dm (0,727) e Ct.Ar (0,720). A espessura do osso cortical da seção transversal da diáfise do fêmur mostrou ainda correlação com a força máxima (0,835) e a rigidez (0,648) obtidas no teste de flexão da diáfise.

6.6 Discussão

O protocolo de aplicação dos estressores utilizado neste experimento foi delineado a partir de diversos autores (GAMARO et al., 2003; DALLA et al., 2005; BAKER et al., 2006; DETANICO et al., 2009; LUCCA et al., 2009). Além de adaptados segundo a infraestrutura disponível em nossos laboratórios, os estressores utilizados neste trabalho são, em geral, mais amenos que os encontrados na literatura. Estas alterações tiveram como objetivo evitar a perda de animais, visto que os animais idosos já se apresentavam debilitados. Embora os ossos dos animais mais velhos sejam maiores que os dos mais jovens, esta mesma metodologia não encontrou diferença na massa óssea entre as idades (Capítulo III). Um dos principais fatores de risco da osteoporose é o pico de massa óssea, entretanto os dados obtidos no Capítulo III não são capazes de informar se os animais jovens já haviam atingido o pico de massa óssea ou se os animais senis mostravam perda óssea relativa à idade. Ratos analisados por Sengupta et al. (2005) mantiveram constante a DMO atingida à puberdade aos três meses de idade até os 36 meses. Os autores também demonstraram que as concentrações de marcadores de metabolismo ósseo no sangue e na urina geralmente estão mais altos antes dos três meses, mas tornam-se estáveis até os 36, o que indica um alto *turnover* ósseo antes da puberdade. A perda óssea causada pelo estresse em ratos idosos ficou evidente apenas na DMO e BV/TV do fêmur; ao contrário da resposta de animais mais jovens, que afetou vários parâmetros de avaliação óssea (Capítulo IV). Glicocorticoides estão entre os principais hormônios secretados na resposta ao estresse (MCEWEN, 2007), e têm a capacidade de induzir a perda de massa óssea (MANELLI e GIUSTINA, 2000; LAFAGE-PROUST et al., 2003; MCILWAIN, 2003). Além disso, a concentração sérica de glicocorticoide naturalmente aumenta com a idade (BUCKINGHAM, 2000) e este aumento por si só também é capaz de comprometer a homeostase óssea (WEINSTEIN et al., 2010). A característica cardinal da perda óssea induzida por glicocorticoide é a diminuição da formação óssea, pois além de comprometer o metabolismo de cálcio, o hormônio tem ação inibitória direta sobre os osteoblastos e seus precursores (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000; LAFAGE-PROUST et al., 2003). Segundo Yirmiya et al. (2006), a norepinefrina parece ser o principal mediador da perda óssea induzida em camundongos por um protocolo de estresse moderado crônico. Os efeitos da simpatectomia química em modelos animais

sobre a atividade osteoclástica são contraditórios (CHERRUAU et al 1999; SHERMAN e CHOLE, 2000), embora não apenas a norepinefrina esteja envolvida nesses casos. O papel do sistema nervoso autônomo no osso ainda precisa ser mais bem esclarecido. É importante lembrar que as funções de formação e reabsorção óssea são acopladas – para a ativação osteoclástica é necessária uma interação célula-célula, mediada pela ligação do RANKL ao seu receptor (WALSH e CHOI, 2003; RHO et al., 2004). Além disso, as funções celulares diminuem no processo de envelhecimento, inclusive seus mecanismos de sinalização (ALEMANY, 2007; CARLSON et al., 2008). A própria indução da resposta ao estresse pode ser mais demorada em idosos, bem como o restabelecimento dos mecanismos ativados nesta resposta (BUCKINGHAM, 2000). Da mesma forma, a recuperação dos efeitos que o estresse causa no organismo pode ser mais longa em animais mais velhos (KOBAN e STEWART, 2006). Entretanto, a possibilidade de que a perda óssea induzida por estresse seja mais lenta nos animais senis precisa ser mais profundamente investigada. Em humanos, o isolamento deste efeito é impalpável, pois são muitos os fatores envolvidos no metabolismo ósseo e o estresse seria apenas um agravante. A deficiência de estrógeno é considerada a principal causa da osteoporose em mulheres (FAN et al., 2005) e também pode ter um papel importante na osteoporose masculina. É importante ter em mente que, em humanos, a menopausa é um processo natural durante o envelhecimento (BRANN e MAHESH, 2005; NEAL-PERRY et al., 2010). A característica cardinal da osteoporose induzida pela deficiência do hormônio sexual é o aumento da reabsorção óssea. Outros fatores também podem contribuir para a perda de massa óssea, fatores cujo valor biológico muitas vezes reflete questões culturais ou socioeconômicas e de grande importância quando se trata da população idosa, como o tabagismo, alcoolismo, deficiências nutricionais e doenças concomitantes (CENTER e EISMAN, 1997).

6.7 Conclusões

O estresse moderado crônico, além de estimular a perda de peso corporal dos animais, foi capaz de afetar apenas a densidade mineral, o volume trabecular e a tenacidade da diáfise do fêmur. O efeito do sexo foi detectado na maioria dos parâmetros avaliados, em que as médias apresentadas pelos machos foram maiores que as apresentadas pelas fêmeas. A interação entre sexo e estresse foi verificada apenas no volume trabecular da cabeça do fêmur, em que a diminuição de osso trabecular foi maior entre os machos. Os animais senis mostraram-se menos sensíveis à perda de massa óssea induzida pelo estresse que ratos mais jovens avaliados em análise anterior utilizando as mesmas condições apresentadas neste trabalho. Isso sugere que o envelhecimento pode retardar a resposta do tecido ósseo aos estímulos desencadeados pelo estresse.

6.8 Referências bibliográficas

ALEMANY, R.; PERONA, J. S.; SÁNCHEZ-DOMINGUEZ, J. M.; MONTERO, E.; CAÑIZARES, J.; BRESSANI, R.; ESCRIBÁ, P. V.; RUIZ-GUTIERREZ, V. G. Protein-coupled receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, p.964-975, 2007.

AUSTAD, S. N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.126, p.43-49, 2005.

BAKER, S. L.; KENTNER, A. C.; KONKLE, A. T.M.; BARBAGALLO, L. S.-M.; BIELAJEW, C. Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats. **Physiology & Behavior**, v.87, p.314-322, 2006.

BRANN, D. W.; MAHESH, V. B. The aging reproductive neuroendocrine axis. **Steroids**, v.70, p.273-283, 2005.

BUCKINGHAM, J. C. Effects of Stress on Glucocorticoids. In: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress*, vol.2. Academic Press: San Diego, 2000, p.190-197.

CARLSON, M. E.; SILVA, H. S.; CONBOY, I. M. Aging of signal transduction pathways, and pathology. **Experimental Cell Research**, v.314, p.1951-1961, 2008. CHERRUAU, 1999.

CENTER, J.; EISMAN, J. The epidemiology and pathogenesis of osteoporosis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.11, n.1, p.23-62, 1997.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; DROSSOPOULOU, G.; SAGORARIS, M.; KOKRAS, N.; SFIKAKIS, A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? **Neuroscience**, v.135, n.3, p.703-714, 2005.

DETANICO, B. C.; PIATO, A. L.; FREITAS, J. J.; LHULLIER, F. L.; HIDALGO, M. P.; CAUMO, W.; ELISABETSKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. **European Journal of Pharmacology**, v.607, v.1-3, p.121-125, 2009.

FAN, Y.; LIU, J.; WANG, S.; WANG, H.; SHI, F.; XIONG, L.; HE, W.; PENG, X. Functional Proteome of Bones in Rats with Osteoporosis Following Ovariectomy. **Life Sciences**, v. 76, p. 2893-2901. 2005.

GALI, J. C. Osteoporose. **Revista Acta Ortopedica Brasileira**, v. 9, p. 53-62. 2001.

GAMARO, G. D.; MANOLI, L. P.; TORRES, I. L. S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v.42, p.107-114, 2003.

KOBAN, M.; STEWART, C. V. Effects of age on recovery of body weight following REM sleep deprivation of rats. **Physiology & Behavior**, v.87, p.1-6, 2006.

LAFAGE-PROUST, M. H.; BOUDIGNON, B.; THOMAS, T. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathophysiology Data and Recent Treatments. **Joint Bone Spine**, n. 70, v. 109-118. 2003.

LICATA, A. Osteoporosis in Men: Suspect secondary Disease first. LICATA, A. Osteoporosis in Men: Suspect secondary Disease first. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.70, p.247-254. 2003.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International**, v.54, p.358-362, 2009.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, p.79-85. 2000.

MCEWEN, X. X. Definitions and Concepts of Stress. In: Fink, G. (Ed.), **Encyclopedia of Stress**, vol.3. Academic Press: San Diego, 2000, p.653.

MCILWAIN, H. H. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **Preventive Medicine**, v.36, p.243-249. 2003.

NEAL-PERRY, G.; NEJAT, E.; DICKEN, C. The neuroendocrine physiology of female reproductive aging: An update. **Maturitas**, v.67, p.34-38, 2010.

PARDON, M.-C. Stress and ageing interactions: A paradox in the context of shared etiological and physiopathological process. **Brain Research Reviews**, v.54, p.251-273, 2007.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUS, F. H. ; KANIS, J. A. ; MALLUCHE, H. ; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M. ; RECKER, R. R. Bone Histomorphometry : Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.2, n.6, p.595-610, 1987.

RHO, J.; TAKAMI, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. **Molecular and Cells**, v. 17, p. 1-9. 2004.

SANDI, C.; TOUYAROT, K. Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates. **Neurobiology of Aging**, v.27, p.128-140, 2006.

SENGUPTA, S.; ARSHAD, M.; SHARMA, S.; DUBEY, M.; SINGH, M. M. Attainment of peak bone mass and bone turnover rate in relation to estrous cycle, pregnancy and lactation in colony-bred Sprague-Dawley rats: Suitability for studies on pathophysiology of bone and therapeutic measures for its management. **Journal of Steroids Biochemistry & Molecular Biology**, v.94, p.421-429, 2005.

SHERMAN, B. E.; CHOLE, R. A. Sympathectomy, which induces membranous bone remodeling, has no effect on endochondral long bone remodeling in vivo. **J Bone Miner Res**, v.15, n.7, p.1354-60, 2000.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE Axis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, p.251-263. 2003.

WEINSTEIN, R. S.; WAN, C.; LIU, Q.; WANG, Y.; ALMEIDA, M.; O'BRIEN, C. A.; THOSTENSON, J.; ROBERSON, P. K.; BOSKEY, A. L.; CLEMENS, T. L.; MANOLAGAS, S. C. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. **Aging Cell**, v.9, p.147-161, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis. WHO Technical Report Series, v. 921, 193p. 2003.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I.; BAJAYO, A.; KREISEL, T.; FELDMAN, S.; TAM, J.; TREMBOVIER, V.; CSERNUS, V.; SHOHAMI, E.; BAB, I. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.45, p.16876-16881 (2006).

ZIEGLER, R; KASPERK, C. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Prevention and Treatment. **Steroids**, v.63, p.344-348. 1998.

7 CAPÍTULO VI

EFEITO DO ESTRESSE MODERADO CRÔNICO SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, HORMÔNIOS SEXUAIS E DOS MARCADORES ÓSSEOS RANKL, RANK E OPG

7.1 Resumo

O estresse representa uma grande ameaça à saúde da população e pode comprometer consideravelmente a qualidade de vida dos idosos. Um de seus efeitos no organismo está o comprometimento do metabolismo ósseo, induzindo a diminuição de massa óssea, podendo contribuir para o risco de fraturas. Vários mediadores estão envolvidos no equilíbrio do metabolismo ósseo, como os hormônios sexuais, as citocinas inflamatórias, que, dentre outros efeitos, modulam a expressão de RANKL, RANK e OPG. Para determinar o efeito do estresse sobre estes fatores, e sua relação com sexo e idade, ratos, machos e fêmeas, adultos jovens e senis, foram submetidos a um protocolo de estresse moderado crônico por 28 dias, incluindo como estressores: frio, calor, imobilização, inclinação da gaiola, isolamento, iluminação noturna, privação de água e de ração. Após este período, os animais foram eutanasiados e tiveram sangue e ossos coletados. Por ELISA, foram avaliadas as concentrações séricas de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como de estradiol e testosterona. RANKL, RANK e OPG foram avaliados por imunistoquímica no fêmur e na vértebra L5. Estresse, sexo e idade não apresentaram efeito principal estatisticamente válido sobre as citocinas. As concentrações de TNF- α diminuíram nos machos, enquanto o contrário foi observado nas fêmeas. Já IL-1 β diminuiu nos jovens e aumentou nos senis. As alterações sobre os hormônios sexuais também não foram significativas, exceto entre sexos. A imunomarcagem para RANKL nos animais submetidos ao estresse mostraram-se mais fortes que no grupo controle. As diferenças entre a expressão de RANK e OPG, bem como efeitos do sexo e da idade não puderam ser detectadas.

Palavras-chave: sexo, idade, estresse, RANKL, RANK, OPG, estradiol, testosterona, IL-1 β , IL-6, TNF- α .

7.2 Abstract

EFFECT OF CHRONIC MILD STRESS ON EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES, SEX HORMONES AND BONE MARKERS RANKL, RANK AND OPG

Stress is an important threat to public health and it can significantly impair elderly welfare. One of its effects in the body is to impairing bone metabolism, leading to decreased bone mass and contributing to elevated risk of fractures. Several mediators are involved in bone metabolism balance, such as sex hormones and inflammatory cytokines that can modulate RANKL, RANK and OPG expression. To determine stress effects on these factors and their relation to sex and age, male and female rats, aged 5 and 22-24 months, were subjected to a protocol of chronic mild stress during 28 days, including as stressors: cold, heat, immobilization, tilt cage, isolation, night lighting, and water and food deprivation. After this period, the animals were euthanized and blood and bones were collected. ELISA evaluated IL-1 β , IL-6 and TNF- α serum concentrations, as well as estradiol and testosterone levels. RANKL, RANK and OPG expression were assessed by immunohistochemistry in the femur and L5 vertebra. Stress, sex and age showed no statistically valid major effect on cytokines. TNF- α concentrations decreased in males, whereas the opposite effect was observed in females. IL-1 β decreased in young rats and increased in the senile. Alterations in sex hormones were not significant, except for gender. Immunostaining for RANKL in animals subjected to stress was stronger than in control. Differences between RANK and OPG expression by sex, age or stress, as well as effects of sex and age could not be detected.

Keywords: sex, age, stress, RANKL, RANK, OPG, estradiol, testosterone, IL-1 β , IL-6, TNF- α .

7.3 Introdução

O estresse representa uma grande ameaça à saúde da população no mundo moderno e pode comprometer consideravelmente a qualidade de vida dos idosos (PARDON, 2007). A partir da observação de que pacientes com depressão apresentam comprometimento da massa óssea (CIZZA, 2001; YAZICI, 2003; KAHL et al., 2005), o modelo de estresse moderado crônico empregado em animais mostrou-se capaz de afetar negativamente o metabolismo ósseo (YIRMIYA et al., 2006; Capítulo IV), porém este efeito pode ser diferente entre os animais jovens e os idosos (Capítulo V). Muitos mecanismos envolvidos na homeostase óssea podem ser modulados pelo estresse, como a produção de hormônios sexuais (RIGGS et al., 2002; ALEXANDRE, 2005; EPEL, 2008) e a expressão de citocinas inflamatórias (ROHLEDER et al., 2002; DUNN et al., 2005). É importante lembrar que as diversas substâncias que têm propriedades osteotrópicas atuam alterando o equilíbrio entre a expressão e a ligação de RANKL e seus receptores RANK e OPG (GRCEVIC et al., 2001; FENG, 2005), um sistema de citocinas da família TNF, por meio do qual o organismo regula o processo de remodelação óssea (WALSH e CHOI, 2003). O presente trabalho visa investigar os efeitos do estresse, da idade e do sexo sobre os hormônios sexuais e a expressão de citocinas inflamatórias, e a resposta da expressão óssea de RANKL, RANK e OPG em modelo animal utilizando ratos.

7.4 Metodologia

7.4.1 Animais

Os procedimentos adotados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Processo 52/2009), com base na legislação vigente. Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas com cinco meses de idade ou entre 22 e 24 meses, foram adquiridos do Biotério Central da UFV. Os animais senis faziam parte do grupo de matrizes de reprodução do biotério e seriam descartados com por volta dos 12 meses de idade, quando foram adquiridos para o presente trabalho. Durante um ano, eles foram mantidos em sala climatizada, recebendo apenas água e ração comercial, até que atingissem a idade desejada para o estudo. Os animais foram divididos em oito grupos segundo o sexo, a idade e o tratamento (Tabela 7.1). Cada grupo era constituído por 5 animais. Neste trabalho, os animais de 22 a 24 meses são denominados senis e os de 5 meses, jovens. No período de manutenção dos animais senis para que atingissem a idade adequada, dois animais a óbito, por isso, ao final do experimento, os grupos controle de animais senis apresentaram apenas 4 indivíduos para cada sexo.

Tabela 7.1 Distribuição dos animais por grupo, segundo sexo, idade e tratamento.

Grupo	Sexo	Idade	Tratamento	n
1	Macho	Jovem	Controle	5
2	Macho	Senil	Controle	5
3	Fêmea	Jovem	Controle	5
4	Fêmea	Senil	Controle	5
5	Macho	Jovem	Estresse	5
6	Macho	Senil	Estresse	5
7	Fêmea	Jovem	Estresse	5
8	Fêmea	Senil	Estresse	5

7.4.2 Estresse crônico

Durante o experimento, os grupos foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro ou cinco animais por gaiola) em sala ambientada com ciclos de 12 horas de luz/escuro. O protocolo de aplicação de estresse utilizado neste experimento foi anteriormente descrito no Capítulo II, com a aplicação de oito fatores estressores, durante 28 dias conforme mostrado na Tabela 7.2. No 29º dia, os animais foram eutanasiados e tiveram o sangue, o fêmur direito e a vértebra L5 coletados.

Tabela 7.2 Cronograma de aplicação dos estressores.

Dias	Estressor	Hora Início	Duração
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	

7.4.3 Imunoistoquímica

Após fixação, os ossos foram descalcificados em ácido fórmico, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram realizados cortes longitudinais do corpo da vértebra e da cabeça do fêmur na espessura de 4 µm. As secções foram dispostas em lâminas silanizadas (Immunoslides®). Após desparafinização, os cortes foram reidratados em soluções decrescentes de álcool e finalmente em PBS pH7,0. A recuperação antigênica foi realizada em solução de tripsina (1mg/mL); o bloqueio da biotina endógena, em solução de clara de ovos seguida por solução de leite em pó desnatado; e o bloqueio da peroxidase endógena, realizado após a incubação com o anticorpo secundário, com solução de H₂O₂ a 3% em PBS. Foram utilizados anticorpos policlonais de cabra anti-RANKL, RANK e OPG

(Santa Cruz Biotechnology, Inc.) como anticorpos primários, na diluição de 1:50; e anticorpo biotilado de coelho anti-IgG de cabra (Sigma), como secundário, diluído na proporção de 1:100. A marcação foi revelada após incubação com polímero estreptavidina-peroxidase (Sigma), na diluição de 1:200; seguida por DAB (Sigma). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris e a lamínula montada em Entellan® (Merck).

7.4.4 Hormônios sexuais e citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α

Os hormônios sexuais e as citocinas foram mensurados no soro por ELISA. Para estradiol e testosterona utilizaram-se kits Interkit® e para as citocinas, kits específicos Raybiotech®.

7.4.5 Análise estatística

Foram calculados os efeitos do sexo e da idade, bem como da interação destes fatores, sobre os parâmetros ósseos, por delineamento fatorial utilizando-se o programa computacional Minitab Statistical Software® versão 15 com nível de significância de 5% para todas as análises, ou como especificado na descrição dos resultados. A relação entre os hormônios e as citocinas foi verificada pelo teste de correlação de Pearson. A expressão imunoistoquímica de RANKL, RANK e OPG foi submetida a uma análise descritiva.

7.5 Resultados

7.5.1 Hormônios sexuais

O estresse moderado crônico não foi capaz de alterar a concentração dos hormônios sexuais. Além da diferença óbvia entre os sexos, a 5% de nível de significância, a única alteração significativa foi um efeito de interação entre sexo e idade sobre os níveis de estrógeno - com a idade, a concentração deste hormônio aumentou nos machos e diminuiu nas fêmeas. Quanto à testosterona, nota-se uma tendência à diminuição de sua concentração nos ratos machos (Tabela 7.3).

Tabela 7.3 Valores de p, médias e desvio-padrão para testosterona e estrógeno

	Testosterona	Estrógeno
Estresse	0,199	0,758
Sexo	0,000	0,003
Idade	0,081	0,745
Estresse*Sexo	0,177	0,115
Estresse*Idade	0,738	0,823
Sexo*Idade	0,080	0,034
Estresse*Sexo*Idade	0,802	0,566
Machos Jovens Controle	2,23 ± 1,49	13,9 ± 1,2
Machos Senis Controle	1,15 ± 0,83	17,5 ± 0,8
Fêmeas Jovens Controle	0,08 ± 0,03	23,4 ± 7,5
Fêmeas Senis Controle	0,06 ± 0,02	20,0 ± 4,1
Machos Jovens Estresse	1,39 ± 1,17	16,0 ± 1,9
Machos Senis Estresse	0,61 ± 0,57	18,7 ± 1,2
Fêmeas Jovens Estresse	0,07 ± 0,02	20,0 ± 4,6
Fêmeas Senis Estresse	0,10 ± 0,05	18,6 ± 2,1

7.5.2 Citocinas inflamatórias

A 5% de significância, o estresse sozinho não mostrou efeito sobre as concentrações de citocinas. Entretanto, IL-6 mostrou uma tendência a diminuir nos animais submetidos ao protocolo. TNF- α sofreu efeito da interação entre o estresse e o sexo - em machos sua concentração diminuiu, enquanto nas fêmeas, aumentou. As alterações dos níveis de IL-1 β após a aplicação do estresse mostraram ser dependentes da idade do animal, diminuindo nos mais jovens e aumentando nos senis. Embora não significativo a 5%, IL-6 mostrou uma leve tendência a esse mesmo comportamento (Tabela 7.4).

Tabela 7.4 Valores de p, médias e desvio-padrão para IL-1 β , IL-6 e TNF- α

	IL-1β	IL-6	TNF-α
Estresse	0,357	0,058	0,556
Sexo	0,604	0,208	0,775
Idade	0,940	0,990	0,992
Estresse*Sexo	0,198	0,138	0,018
Estresse*Idade	0,006	0,051	0,528
Sexo*Idade	0,831	0,441	0,964
Estresse*Sexo*Idade	0,596	0,383	0,872
Machos Jovens Controle	0,263 \pm 0,016	0,169 \pm 0,017	0,193 \pm 0,021
Machos Senis Controle	0,205 \pm 0,058	0,155 \pm 0,023	0,184 \pm 0,040
Fêmeas Jovens Controle	0,244 \pm 0,080	0,149 \pm 0,026	0,159 \pm 0,034
Fêmeas Senis Controle	0,196 \pm 0,036	0,136 \pm 0,021	0,152 \pm 0,016
Machos Jovens Estresse	0,195 \pm 0,025	0,125 \pm 0,010	0,161 \pm 0,020
Machos Senis Estresse	0,259 \pm 0,033	0,151 \pm 0,012	0,171 \pm 0,009
Fêmeas Jovens Estresse	0,241 \pm 0,017	0,138 \pm 0,015	0,190 \pm 0,022
Fêmeas Senis Estresse	0,278 \pm 0,091	0,141 \pm 0,032	0,195 \pm 0,074

As citocinas mostraram correlação válida entre si, com coeficiente de correlação variando entre 0,635 e 0,740. Os hormônios sexuais mostraram uma correlação muito baixa, porém negativa. Testosterona não mostrou correlação com qualquer das citocinas. Estrógeno, por sua vez, apresentou coeficientes válidos negativos com IL-6 e TNF- α , mas também muito baixos (Tabela 7.5).

Tabela 7.5 Coeficientes de correlação de Pearson e valores de p entre hormônios sexuais e citocinas

	T	E	IL1	IL6
E	-0,368 0,025			
IL1	0,006 0,972	-0,132 0,437		
IL6	0,268 0,109	-0,327 0,048	0,701 0,000	
TNF	0,170 0,315	-0,353 0,032	0,740 0,000	0,635 0,000

T: testosterona; E: estrógeno

7.5.3 Imunoistoquímica

Todas as lâminas mostraram marcação imunoistoquímica evidente, de forma que as diferenças foram muito discretas. De maneira geral, houve diferença perceptível na imunomarcação para RANKL, que se mostrou mais expressiva nos grupos submetidos ao estresse. Alterações relativas à idade, sexo ou osso utilizado não foram percebidas (Figura 7.1). As imunomarcações para RANK e OPG não mostraram diferença aparente entre os grupos (Figura 7.2).

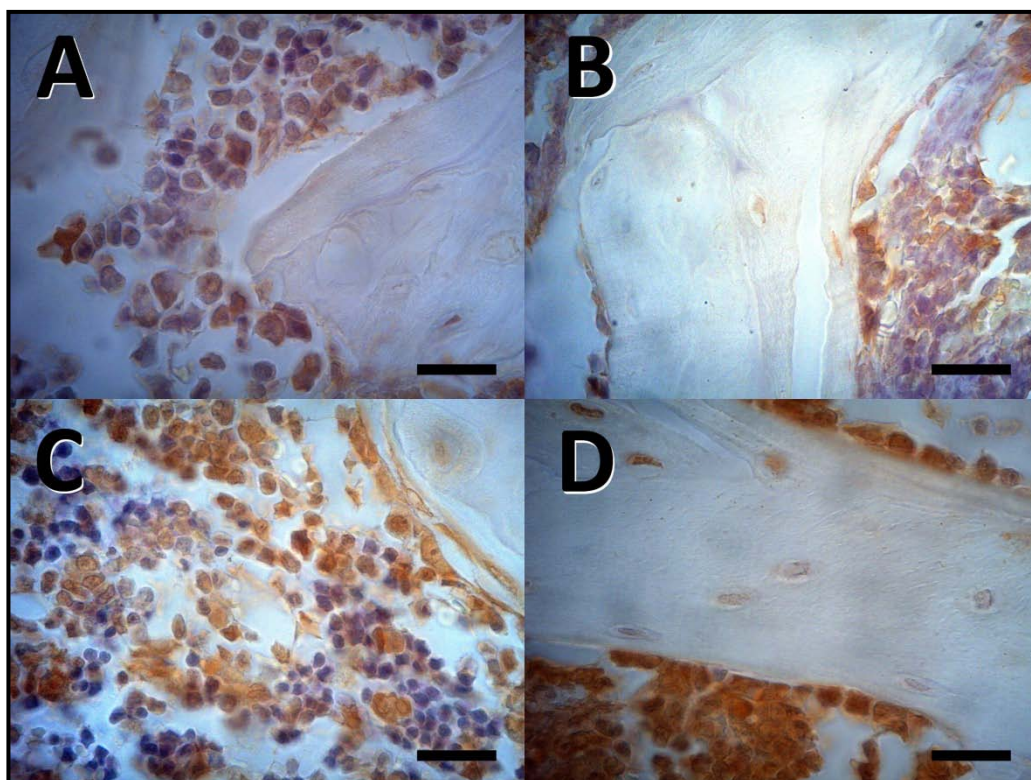


Figura 7.1 Imunoistoquímica para avaliação da expressão de RANKL. (A) Fêmur de uma fêmea senil controle; (B) Vértebra de macho jovem controle; (C) Fêmur de fêmea jovem submetida a estresse; (D) Vértebra de macho jovem submetido a estresse. A barra corresponde a 20µm.

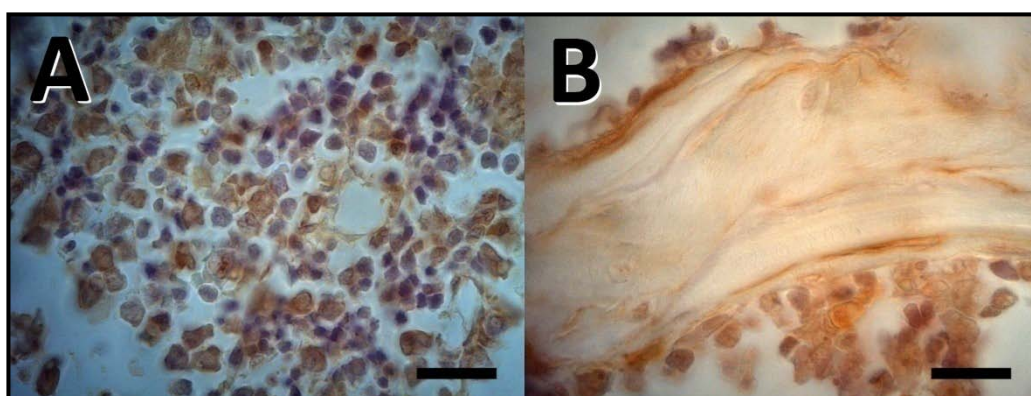


Figura 7.2 Padrão de marcação imunoistoquímica para RANK e OPG. (A) Imunomarcção para RANK em vértebra de macho senil submetido a estresse e (B) para OPG em fêmur de fêmea senil submetida a estresse. A barra corresponde a 20µm.

7.6 Discussão

Testosterona e estrógeno avaliados no presente experimento não apresentaram qualquer efeito do estresse, ou seja, o estresse moderado crônico não induziu alterações nas concentrações de hormônios sexuais. Tsuchiya & Horii (1995) utilizaram hamsters machos sob estresse de imobilização por períodos diferentes: 10 e 30 minutos, e duas e seis horas. Os autores observaram uma drástica diminuição da testosterona nos dois períodos mais longos. No segundo caso, 18h após a retirada do estresse, a diminuição da concentração do hormônio ainda era observada. Chichinadze & Chichinadze (2008) observaram que o aumento da testosterona pode aumentar em resposta ao estresse principalmente no início da aplicação do estressor e que questões sociais, como a dominância de um macho sobre os outros, podem estar envolvidas. Os animais utilizados neste experimento foram mantidos em gaiolas coletivas. Mesmo não tendo tido contato físico ou visual com as fêmeas, mas provavelmente olfativo, uma vez que todas as gaiolas foram mantidas na mesma sala, é possível que tenha havido desenvolvimento de algum tipo de dominância entre os animais. Embora os dados da concentração de testosterona obtidos sejam heterogêneos e apresentem alto valor para o desvio-padrão, o que reforça a diferença dentro do grupo, avaliações comportamentais seriam necessárias para confirmar essa hipótese. Retana-Márquez et al. (2003) comentam que o comportamento sexual em machos é um aspecto da reprodução masculina muito vulnerável tanto a estresse agudo quanto crônico. Embora se associem esses efeitos a uma relação antagonista entre testosterona e glicocorticoide, poucos trabalhos de fato avaliam esta relação. Utilizando três tipos de estressores (choque, imobilização e imersão em água fria) o grupo de Retana-Márquez mostrou que os níveis de hormônio masculino variam com o tipo e a duração do estressor. Dos três estressores utilizados pelos autores, apenas a imobilização foi empregada no presente trabalho. Nas observações daquela pesquisa, este foi o estressor que menos afetou os níveis de testosterona. Embora existam muitos trabalhos que avaliem o efeito do estresse no ciclo estral, poucos avaliam as concentrações de estrógeno dos animais. De fato, uma limitação para essa medida é a flutuação de sua concentração devido aos ciclos nas fêmeas. Entretanto, no presente trabalho, os dados sobre a concentração de estrógeno mostraram-se estatisticamente válidos, porém nenhuma interferência sofreram por causa do estresse, tanto em machos quanto em fêmeas. Os trabalhos que avaliam o efeito do

estresse sobre o ciclo estral utilizam *swabs* vaginais para determinar a fase em que a fêmea se encontra. De maneira geral, o estresse aumenta o número de ciclos irregulares (DALLA et al., 2005). O papel do estradiol sob condições de estresse, entretanto, é vastamente estudado no campo da neurologia. Bowman et al. (2002), por exemplo, utilizando ratas castradas, notaram que o estradiol pode moderar o efeito do estresse na cognição e ansiedade. Takuma et al. (2007) mostram que este hormônio atenua a perda de neurônios no hipocampo e a disfunção cognitiva induzidas por imobilização crônica. No presente trabalho, o estresse sozinho não causou alteração nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Na literatura científica, a resposta da expressão de citocinas ao protocolo de estresse moderado crônico geralmente são confrontados com as alterações vistas em humanos que sofrem de depressão, uma vez que ele é o modelo padrão para o estudo desta doença. Alterações no perfil de citocinas pró-inflamatórias são altamente correlacionadas à depressão e acredita-se que os sintomas da doença sejam provocados pela atuação das citocinas no sistema nervoso central (ROHLEDER et al., 2002; DUNN et al., 2005). Além disso, a depressão vem sendo apontada como fator de risco para outras doenças como as cardiovasculares, em que o papel das citocinas também tem sido investigado (LEVINE et al., 1990; FERRARI, 1999). O presente trabalho trata das citocinas como um dos fatores capazes de influenciar o metabolismo ósseo. Embora os grupos submetidos ao estresse apresentassem concentrações de IL-6 menores que os grupos controle, esta diminuição não foi significativa a 5%. Grippo et al (2005) submeteram ratos Sprague-Dawley a quatro semanas de estresse moderado crônico e também não verificaram alteração na IL-6; os autores porém perceberam aumento em TNF- α e IL-1 β . No presente trabalho, estas citocinas mostraram resposta ao estresse dependente das outras variáveis, sendo mais notável o aumento de TNF- α nas fêmeas e de IL-1 β nos senis. Para investigar a resposta destas duas citocinas, foi realizado o teste de Tukey ($\alpha=0,050$), que demonstrou diferença entre qualquer dos grupos (dados não apresentados). Sexo e idade são dois fatores importantes na determinação da resposta imunológica e ao estresse (RIVIER, 1999; KAJANTIE e PHILLIPS, 2006). O sistema de citocinas representa um ponto convergente entre a resposta imunológica e o metabolismo ósseo. Em processos inflamatórios da articulação ou mesmo na deficiência de estrógeno, a modulação das citocinas mostra papel importante na patogenia da perda óssea (CENCI et al., 2000; GRČEVIĆ et al., 2001; BEZERRA et al., 2005). IL-1, IL-6 e TNF- α são reguladores positivos da expressão de RANKL, bem como de OPG (WALSH e CHOI, 2003). No

presente trabalho, a expressão imunohistoquímica de RANKL, RANK e OPG mostrou-se presente em todas as amostras, porém, a diferença entre os grupos foi muito sutil, mas ficou mais evidente para RANKL, que também é regulado positivamente por glicocorticoides, que, por sua vez, é capaz de inibir a expressão de OPG (WALSH e CHOI, 2003). OPG é um receptor solúvel produzido por osteoblastos ativados, mas podem ser induzida em linfócitos B e células dendríticas (WALSH e CHOI, 2003). Entretanto, durante a formação óssea, OPG pode ser depositado junto às proteínas da matriz com o intuito de prevenir uma perda óssea quando porventura osteoclastos forem ativados nas imediações. No presente trabalho, houve uma marcação evidente na imunohistoquímica para OPG ao longo da matriz, mas não houve diferença entre os grupos. Isto pode ter ocorrido por causa do tempo empregado no protocolo de estresse e, em um trabalho futuro, um acompanhamento da evolução da expressão dos marcadores ósseos ao longo do tempo é necessário.

7.7 Conclusões

Com relação à testosterona, as médias apresentadas pelos animais submetidos ao estresse foram menores que os dos grupos controle, com exceção das fêmeas senis. Já o estrógeno apresentou comportamento contrário em machos e fêmeas: no primeiro grupo as médias foram maiores nos animais submetidos ao estresse e no segundo, maiores nos controle. É preciso ressaltar que essas alterações não foram estatisticamente significativas, provavelmente devido à grande variação entre os valores individuais; porém o aumento do número de animais por grupo pode contornar este problema em trabalhos futuros. O estresse também não teve efeito como fator principal sobre as citocinas pró-inflamatórias. IL-6 não mostrou qualquer efeito significativo do estresse, embora tenha apresentado uma tendência à diminuição nos animais submetidos ao protocolo. As concentrações de TNF- α diminuíram nos machos, enquanto o contrário foi observado nas fêmeas. Já IL-1 β diminuiu nos jovens e aumentou nos senis. Embora diferenças entre sexo e idade não tenham sido evidentes, a expressão de RANKL mostrou-se mais expressiva nos grupos submetidos ao estresse. RANK e OPG mostraram imunomarcção, mas diferenças entre os grupos não puderam ser percebidas. Talvez pelo fato de que as substâncias investigadas neste trabalho sejam de expressão induzível, seu estudo pode tornar-se mais heterogêneo. Visto que o modelo proposto é inédito, alguns ajustes metodológicos fazem-se necessários.

7.8 Referências bibliográficas

ALEXANDRE, C. Androgens and bone metabolism. **Joint Bone Spine**, v.72, p.202-206, 2005.

BEZERRA, M. C.; CARVALHO, J. F.; PROKOPOWITSCH, A. S.; PEREIRA, R. M. R. RANK, RANKL and Osteoprotegerin in Arthritic Bone Loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v38, p161-170. 2005.

BOWMAN, R. E.; FERGUSON, D.; LUINE, V. N. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. **Neuroscience**, v.113, n.2, p.401-410, 2002.

CENCI, S.; WEITZMANN, M. N.; ROGGIA, C.; NAMBA, N.; NOVACK, D.; WOODRING, J.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, p 1229-1237. 2000.

CHICHINADZE, K.; CHICHINADZE, N. Stress-induced increase of testosterone: Contributions of social status and sympathetic reactivity. **Physiology & Behavior**, v.94, p.595-603, 2008.

CIZZA, G.; RAVN, P.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Depression: A major, unrecognized risk factor for osteoporosis? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, n.5, p.198-203, 2001.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; DROSSOPOULOU, G.; SAGORARIS, M.; KOKRAS, N.; SFIKAKIS, A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? **Neuroscience**, v.135, n.3, p.703-714, 2005.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.891-909, 2005.

EPEL, E. S. Psychological and metabolic stress: A recipe for accelerated cellular aging? **Hormones**, v.8, n.1, p.7-22, 2009.

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

FERRARI, R. The role of TNF in cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v.40, n.2, p.97-105, 1999.

GRČEVIĆ, D.; KATAVIĆ, V.; LUKIĆ, I. K.; KOVAČIĆ, N.; LORENZO, J. A.; MARUŠIĆ, A. Cellular and Molecular Interactions between Immune System and Bone. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 384-392. 2001.

GRIPPO, A. J.; FRANCIS, J.; BELTZ, T. G.; FELDER, R. B.; JOHNSON, A. K. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. **Physiology & Behavior**, v. 84, p.697-706, 2005.

KAHL, K. G.; RUDOLF, S.; STOECKELHUBER, B. M.; DIBBELT, L.; GEHL, H.-B.; MARKHOF, K.; HOHAGEN, F.; SCHWEIGER, U. Bone mineral density, markers of bone turnover, and cytokines in young women with borderline personality disorder with and without comorbid major depressive disorder. **American Journal of Psychiatry**, v.162, p.168-174, 2005.

KAJANTIE, E.; PHILLIPS, D. I. W. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.31, p.151-178, 2006.

LEVINE, B.; KALMAN, J.; MAYER, L.; FILLIT, H. M.; PACKER, M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v.323, p.236-241, 1990.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.939-946, 2005.

PARDON, M.-C. Stress and ageing interactions: A paradox in the context of shared etiological and pathophysiological process. **Brain Research Reviews**, v.54, p.251-273, 2007.

RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA, R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress. RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex Steroids and the Construction and conservation of the Adult Skeleton. **Endocrine Reviews**, v.23, n.3, p. 279-302. 2002.

RIVIER, C. Gender, sex steroids, corticotropin-releasing factor, nitric oxide, and the HPA response to stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.64, n.4, p.739-751, 1999.

ROHLEDER, N.; KUDIENKA, B. M.; HELLHAMMER, D. H.; WOLF, J. M.; KIRSCHBAUM, C. Age and sex steroid-related changes in glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production after psychosocial stress. **Journal of Neuroimmunology**, v.126, p.69-77, 2002.

TAKUMA, K.; MATSUO, A.; HIMENO, Y.; HOSHINA, Y.; OHNO, Y.; FUNATSU, Y.; ARAI, S.; KAMEI, H.; MIZOGUCHI, H.; NAGAI, T.; KOIKE, K.; INOUE, M.; YAMADA, K. 17beta-Estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats. **Neuroscience**, v.146, p.60-68, 2007.

TSUCHIYA, T.; HORII, I. Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male syrian hamsters. **Psychoneuroendocrinology**, v.20, n.1, p.95-102, 1995.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE Axis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, p.251-263. 2003.

8 CONCLUSÕES GERAIS

O objetivo geral do presente trabalho é investigar a interação entre três processos: estresse, envelhecimento e metabolismo ósseo; em meio aos quais sempre se permeia o papel do sexo, pautado principalmente na fisiologia dos hormônios sexuais, que dita importante dimorfismo na resposta àqueles três processos.

Primeiramente, foi demonstrado o efeito que o sexo e a idade podem exercer sobre os parâmetros de avaliação óssea. Os ratos machos são maiores que as fêmeas, bem como os senis, maiores que os adultos jovens. Este princípio pôde ser demonstrado também nos parâmetros morfométricos avaliados neste trabalho, como as medidas histomorfométricas da seção transversal da diáfise do fêmur e a área do fêmur e da tíbia avaliados na densitometria. O conteúdo mineral ósseo apresentou o mesmo comportamento, visto que depende diretamente da área do osso. A densidade mineral óssea, parâmetro muito importante na avaliação da perda óssea e utilizado como medida padrão para o diagnóstico da osteoporose, não apresentou diferença provocada pelo sexo nem pela idade do animal. Outro parâmetro importante na avaliação óssea é o volume trabecular, aferido neste trabalho na cabeça do fêmur e no corpo vertebral. Este parâmetro apresentou apenas efeito do sexo no fêmur, em que os valores maiores foram observados nos machos. Força máxima e tenacidade, tanto ao teste de flexão da cabeça do fêmur quanto da diáfise, foram maiores nos machos, embora efeito da idade não tenha sido identificado. Estes resultados são importantes em trabalhos posteriores que utilizem protocolos de indução de perda óssea que podem interagir com os fatores sexo e idade.

Em seguida, foi avaliado o efeito do estresse crônico sobre os parâmetros de avaliação óssea. Para isso, foram avaliados apenas os grupos de animais jovens. O estresse mostrou-se capaz de reduzir a densidade mineral óssea, bem como a espessura do osso cortical da seção transversal da diáfise do fêmur, além de afetar o peso dos animais. O estresse ainda teve efeito na cabeça do fêmur, onde diminuiu a o volume trabecular ósseo e a força máxima atingida no teste de flexão. O efeito do sexo apareceu na maior parte todos os parâmetros analisados, em que as médias exibidas pelos machos foram menores que as fêmeas. Com isso, confirmou-se que o estresse pode comprometer o equilíbrio da homeostase óssea, colaborando para o estabelecimento da osteopenia ou osteoporose.

Para investigar o efeito do estresse associado à idade, foram utilizados os ratos de 22-24 meses. O estresse também foi capaz de afetar o peso, mas apenas poucos parâmetros de avaliação óssea, revelando que pode comprometer a saúde óssea, mas de maneira mais branda que nos animais mais jovens. Esse resultado deve ser interpretado com cautela. Provavelmente o envelhecimento poderia retardar a resposta do tecido ósseo aos estímulos desencadeados pelo estresse. De maneira crônica, os efeitos poderiam ser mais severos nos idosos.

Neste mesmo modelo animal, num delineamento que inclui todas as variáveis independentes, ou seja, sexo, idade e tratamento, foi avaliada a resposta de citocinas inflamatórias, hormônios sexuais e da expressão de RANKL, RANK e OPG. Embora não tenham sido estatisticamente significantes, uma diminuição na concentração de testosterona nos grupos submetidos ao estresse pôde ser percebida. Para o estrógeno, houve um comportamento contrário entre o grupo de machos e o grupo de fêmeas – no primeiro, o estresse aumentou a concentração do hormônio, enquanto no segundo, diminuiu. A variação individual das observações foi muito ampla, e um melhor delineamento do modelo, possivelmente envolvendo um número maior de repetições, torna-se necessário para esclarecimento desta questão. Sobre as citocinas inflamatórias, o estresse também mostrou apenas efeito indireto no caso da IL-1 β , que diminuiu nos animais jovens, mas aumentou nos senis, e do TNF- α , que diminuiu nos machos e aumentou nas fêmeas. Diferenças na marcação imunoistoquímica foram percebidas apenas para RANKL em relação devido ao estresse. Provavelmente pelo fato de que as substâncias investigadas nesta última parte do trabalho sejam de expressão induzível, seu estudo pode tornar-se mais heterogêneo. Visto que o modelo proposto é inédito, alguns ajustes metodológicos fazem-se necessários.

ANEXO

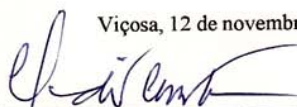
**Cópia do certificado emitido pela Comissão de Ética para o
Uso de Animais da UFV****CERTIFICADO**

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)