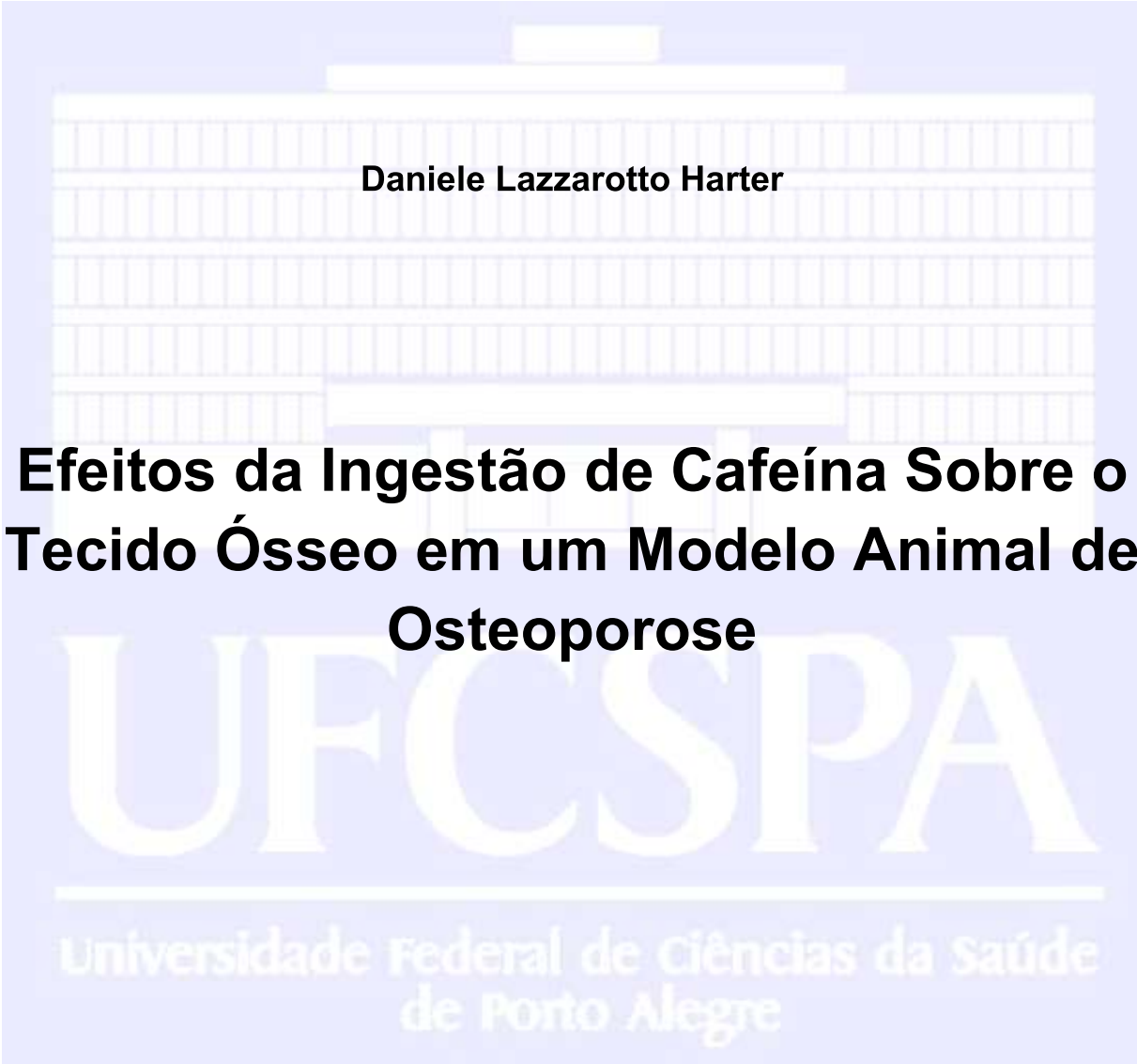


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE - UFCSPA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**



Daniele Lazzarotto Harter

**Efeitos da Ingestão de Cafeína Sobre o
Tecido Ósseo em um Modelo Animal de
Osteoporose**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2013

Daniele Lazzarotto Harter

Efeitos da Ingestão de Cafeína Sobre o Tecido Ósseo em um Modelo Animal de Osteoporose

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Airtón Tetelbom Stein

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Maria De Martini
Vanin

Porto Alegre

2013

Catálogo na Publicação

Harter, Daniele Lazzarotto

Efeitos da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em um modelo animal de osteoporose / Daniele Lazzarotto Harter. -- 2013.

93 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Orientador(a): Airton Tetelbom Stein ;
coorientador(a): Carla Maria de Martini Vanin.

1. densidade óssea. 2. cafeína. 3. osteoporose. 4. ooforectomia. 5. rato. I. Título.

Dedico este trabalho...

... ao meu Amor Daniel, pelo companheirismo e apoio incondicional, por me confortar frente às dificuldades e me fazer sorrir;

... aos meus pais Edson e Eliana, pelo amor dedicado a vida inteira, pela compreensão e pelos valores a mim transmitidos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

Aos meus professores orientadores, Dr. Ailton Stein e Dr^a Carla Vanin, que em meio a muitos problemas, continuaram acreditando neste trabalho e me deram esta oportunidade;

Ao Prof. Sérgio Kato que muito auxiliou na análise dos dados;

Ao pessoal do Laboratório de Estresse Oxidativo, em especial à Dr^a Cláudia Rhoden que me emprestou seu laboratório e me “cedeu” o agora Doutor Paulo Guilherme para me ajudar na parte farmacêutica do meu trabalho;

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia pelo empréstimo do espaço e de materiais;

Ao MD. Roberto Vanin Pinto Ribeiro que se disponibilizou a me ensinar a técnica cirúrgica;

À Dr^a Sabrina Fernandes que me ajudou nas cirurgias e principalmente pela amizade, me ajudando a seguir em frente e ver novas oportunidades;

Ao Dr. Luciano Hoffmann do Centro de Diagnóstico por Imagem do Hospital Dom Vicente Scherer que permitiu, por mais entranho que fosse, que eu fizesse minhas análises no Hospital;

Ao físico Rodrigo Reginatto por diversas noites e finais de semana realizando comigo as análises das imagens do trabalho;

À Dr^a Clarice Krás Borges da Silveira que me deu oportunidade discente sendo minha orientadora no programa REUNI;

Ao incansável e dedicado bibliotecário Vladimir Pinto, que prontamente conseguia os artigos que eu não encontrava de forma alguma;

À querida Inez que cuida com carinho do Biotério da Pós-graduação e está sempre pronta a ajudar;

Aos meus irmãos, Leandro, publicitário, e Márcio, administrador, que ainda acham estranho quando falo do meu mundo de “ratinhos”, pacientes, questionários e laboratórios, mas que sempre me apoiaram;

E agradeço principalmente a Deus, por sempre ter escutado minhas angústias e me dar sua mão para eu trilhar meu caminho com mais sabedoria.

RESUMO

A osteoporose é a doença mais comum do metabolismo ósseo. Mulheres pós-menopáusicas possuem maior risco de fratura devido à falência ovariana. Foi escolhido o modelo animal de osteoporose por mimetizar os efeitos fisiopatológicos da doença em humanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ingestão de cafeína sobre a massa óssea em ratas envelhecidas ooforectomizadas e intactas. Foram utilizadas 16 ratas Wistar de 16 meses. Os animais foram randomizados em 4 grupos: Grupo 1 “OVX-caf”, ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; Grupo 2 “OVX-co”, ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Grupo 3 “Sham-caf”, ratas submetidas à operação simulada com ingestão de cafeína; e Grupo 4 “Sham-co”, ratas submetidas à operação simulada sem ingestão de cafeína. Os animais “OVX-caf” e “Sham-caf” receberam cafeína (100 mg/kg de peso corporal) por gavagem durante 10 semanas, os demais receberam água como controle. No fim do experimento, as colunas lombares e os fêmures direitos foram dissecados. Foram realizadas medidas de parâmetros biofísicos, parâmetros quantitativos por densitometria óssea e tomografia computadorizada quantitativa. Os resultados obtidos foram apresentados em médias e desvios-padrão. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA de um fator seguido de post-hoc de Tukey. Considerou-se significativo $p \leq 0,05$. Foi encontrada diferença estatística nos pesos dos animais e nas avaliações por tomografia, na região intratrocantérica ($p=0,021$) no grupo “OVX-co”. Nos demais parâmetros, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Com tais achados, ainda não foi possível afirmar que a cafeína cause efeito deletério sobre a massa óssea de ratas envelhecidas.

Palavras-chaves: rato, cafeína, osteoporose, ooforectomia, densidade óssea.

ABSTRACT

Osteoporosis is the most common disease of bone metabolism. Postmenopausal women have a higher risk of bone fracture due to ovarian failure. The animal model of osteoporosis was chosen for mimetize the pathophysiological effects of the disease in humans. The aim of this study was evaluate the effects of caffeine intake on bone mass in aged ovariectomized and intact female rats. 16 Wistar female rats of 16 months old were used. The animals were randomized in 4 groups: Group 1 "OVX-caf", ovariectomized rats with caffeine intake; Group 2 "co-OVX", ovariectomized rats without caffeine intake; Group 3 "Sham-caf", rats submitted to sham operation with caffeine intake; and Group 4 "Sham-co", rats submitted to sham operation without caffeine intake. The animals "OVX-caf" and "Sham-caf" received caffeine (100 mg/kg body weight) by gavage for 10 weeks, the remaining animals received water as a control. At the end of the experiment, the lumbar spine and right femurs were dissected. Measured of biophysical parameters, quantitative parameters for bone densitometry and quantitative computed tomography were made. The results were presented as means and standard deviations. For statistical analysis, ANOVA of one factor followed by post-hoc Tukey test were employed. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical difference was found in animal body weights and in measurements by tomography in evaluated regions of interest in the intratrocanteric region ($p = 0.021$) in OVX-co group. In other parameters, no significant differences were observed between groups. In summary, it was not possible to affirm that caffeine causes a deleterious effect on bone mass in aged rats.

Key-words: rat, caffeine, osteoporosis, ovariectomy, bone density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Osteoblastos e osteócitos	14
Figura 2. Componentes do osso	15
Figura 3. Transformação de ativação da Vitamina D	20
Figura 4. Fórmulas químicas dos principais estrogênios.....	22
Figura 5. Fórmula química da molécula de cafeína.....	29
Figura 6. Ooforectomia bilateral	86
Figura 7. Fêmur direito e coluna lombar de rata.....	88
Figura 8. Densitômetro LUNAR DPX, GE®.....	89
Figura 9. Ossos (L1-L4) em análise no densitômetro.....	89
Figura 10. Aquisição das imagens dos ossos por tomografia	90
Figura 11. Imagem volumétrica gerada na estação de trabalho a partir da aquisição na TCQ.....	91
Figura 12. Imagem de fêmur com espessura de 0,6mm para mensuração de densidade nas regiões de interesse a partir de aquisição por TCQ	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definições de osteoporose para mulheres pós-menopáusicas baseadas nas medidas de DXA, segundo a OMS.....	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D: 1,25-di-hidroxivitamina D

ATP: adenosina trifosfato

Ca⁺⁺: cálcio iônico

cAMP: adenosina monofosfato cíclico

CMO: conteúdo mineral ósseo

DBP: proteína ligadora de vitamina D (*vitamin D binding protein*)

DXA: absorciometria de raios-X de dupla energia (*dual-energy X-ray absorptiometry*)

DMO: densidade mineral óssea

ER α : receptor de estrogênio α (*estrogen receptor alpha*)

ICC: coeficiente de variação intraclasse (*intraclass correlation coefficient*)

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

kV: kilovolts

mA: miliampère

MEDOS: *Mediterranean Osteoporosis Study*

mrem: millirem

NF- κ B: fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

OVX: ooforectomia

P_i: fósforo inorgânico ou fosfato livre

P_i: peso imerso

Ps: peso seco

PTH: hormônio paratireóideo (*parathyroid hormone*)

P_u: peso úmido

PVPI: polivinil-pirrolidona-iodo

SXA: absorciometria de raios-X de única energia (*single-energy X-ray absorptiometry*)

TCQ: tomografia computadorizada quantitativa

TGF- β : fator transformador de crescimento- β (*transforming growth factor beta*)

TNF- α : fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor alpha*)

UH: unidades de Hounsfield

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	FISIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO	12
2.1.1	Aspectos histológicos	12
2.1.2	Formação do tecido ósseo	16
2.1.3	Tipos de osso	17
2.1.4	Regulação hormonal no tecido ósseo.....	17
2.1.4.1	Hormônio paratireóideo (PTH)	17
2.1.4.2	Calcitonina	18
2.1.4.3	1,25-di-hidroxivitamina D [1,25(OH) ₂ D]	18
2.1.4.4	Glicocorticoides	21
2.1.4.5	Estrogênios	21
2.2	MENOPAUSA	22
2.3	OSTEOPOROSE	23
2.3.1	Caracterização.....	23
2.3.2	Fisiopatologia.....	24
2.3.3	Diagnóstico	25
2.3.4	Causas	27
2.3.4.1	Efeitos da cafeína no tecido ósseo	27
2.3.4.1.1	<i>Cafeína</i>	29
2.4	MODELO ANIMAL DE OSTEOPOROSE.....	30
3	REFERÊNCIAS	32
4	OBJETIVOS.....	38
5	ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
	ANEXO I – Composição da ração de roedores Nuvital® Nuvilab CR-1	69
	ANEXO II – Parecer consubstanciado do projeto de pesquisa	70
	ANEXO III – Normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia	76
	APÊNDICE I – Cirurgia de ooforectomia bilateral realizada nas ratas dos grupos OVX-co e OVX-caf	86

APÊNDICE II – Ossos dissecados dos animais da pesquisa	88
APÊNDICE III – Aquisição de imagens por densitometria óssea realizada no Hospital Dom Vicente Scherer	89
APÊNDICE IV – Aquisição de imagens por tomografia computadorizada quantitativa realizada no Hospital Dom Vicente Scherer	90
APÊNDICE V – Imagens de tomografia computadorizada quantitativa em análise na estação de trabalho	91

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença metabólica caracterizada por baixa massa óssea com deterioração da microarquitetura do osso, resultando em maior fragilidade do tecido ósseo com consequente perda da força óssea e aumento do risco de fraturas.¹⁻³ O processo de perda da massa óssea tem seu início ainda antes do momento da menopausa, mas é com a diminuição da produção dos hormônios ovarianos, basicamente o estrogênio, que acontece uma marcada aceleração da perda óssea nos primeiros anos após a menopausa.⁴ O acúmulo de massa óssea até a maturidade é também influenciado pelo estado hormonal, sendo que o estrogênio parece ser necessário para a aquisição do pico de massa óssea em homens e mulheres.⁵ No entanto, a deficiência de estrogênio está associada à hiperatividade dos osteoclastos e aumento da reabsorção óssea em comparação à formação óssea.⁵

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos relacionando a ingestão de cafeína e os efeitos deletérios no tecido ósseo. Os primeiros estudos mostraram efeitos negativos da cafeína sobre o metabolismo ósseo, demonstrando um aumento na diurese levando a uma calciúria aguda⁶⁻⁸, motivos pelos quais, o consumo de cafeína foi rapidamente incluído como um fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose. No entanto, trabalhos posteriores questionaram sobre a provável importância da cafeína como um fator contribuinte no processo da doença.⁹

Os estudos epidemiológicos sobre os efeitos da cafeína no osso são realizados, na maioria das vezes, na população feminina.^{10,11} Embora alguns estudos em animais não tenham sido capazes de demonstrar um efeito negativo definitivo da cafeína no metabolismo ósseo,^{12,13} outros estudos demonstraram que a cafeína apresenta efeito deletério sobre o desenvolvimento e o crescimento normal do osso.^{14,15}

O modelo de ratas ooforectomizadas é considerado adequado para verificar osteoporose na menopausa humana devido às semelhanças em seus mecanismos fisiopatológicos. Em ambas as espécies, a perda de massa óssea é mais rápida após a deficiência de estrogênio, que leva a um aumento no processo de remodelação óssea, cuja reabsorção óssea é superior à formação.¹⁶ Ainda, tanto em ratos quanto em

humanos, ocorre uma maior perda no osso trabecular quando comparada ao osso cortical, a absorção intestinal de cálcio é diminuída e as respostas do esqueleto são semelhantes às ações de prevenção e tratamento da osteoporose.¹⁶

O modelo experimental foi escolhido devido ao maior controle das variáveis, como indução da osteoporose e a quantificação do consumo de cafeína. Em estudos realizados em humanos, o acesso ao consumo dessa substância é de difícil mensuração. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de cafeína em modelo animal de osteoporose induzida e espontânea, utilizando ratas idosas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISILOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo possui funções básicas como suporte, proteção, locomoção e, ainda, funções metabólicas. Através da função metabólica, atua como reservatório de cálcio, fósforo e outros íons que podem ser liberados ou estocados de maneira controlada para manter as concentrações constantes destes íons nos fluidos corporais.^{17,18}

2.1.1 Aspectos histológicos

O osso é um tecido conectivo especializado composto de material intracelular calcificado, a matriz óssea. Há três tipos de células: (i) osteócitos – encontrados em cavidades (osso lacunar) e entre camadas (osso lamelar) da matriz óssea; (ii) osteoblastos – sintetizam compostos orgânicos da matriz, e (iii) osteoclastos – células gigantes multinucleadas envolvidas nos processos de reabsorção e remodelação do tecido ósseo.¹⁸ As trocas entre os osteócitos e os vasos capilares dependem da comunicação através de canalículos que atravessam a matriz óssea. Todos os ossos são revestidos tanto interna quanto externamente, por camadas de tecido conjuntivo

contendo células osteogênicas, sendo o endósteo na superfície interna e o periósteo na superfície externa.¹⁸ Os tipos celulares são vistos na Figura 1.

Os ossos geralmente possuem duas camadas: uma externa de osso compacto denso e uma camada interna de osso esponjoso trabecular. O osso compacto fornece resistência e é mais espesso onde seja necessária a sustentação – ex. ossos dos membros inferiores e locais de inserções musculares; o osso esponjoso é menos resistente e tem espaços que são preenchidos por células entre as trabéculas da rede calcificada.² Os componentes do osso citados podem ser visualizados na Figura 2. O processo de diferenciação celular na formação do tecido ósseo é regulado por genes que estabelecem a estrutura esquelética sob a forma de cartilagem e mesênquima e depois os ossifica pela ação dos osteoblastos em ossificação endocondral e membranosa.¹⁷

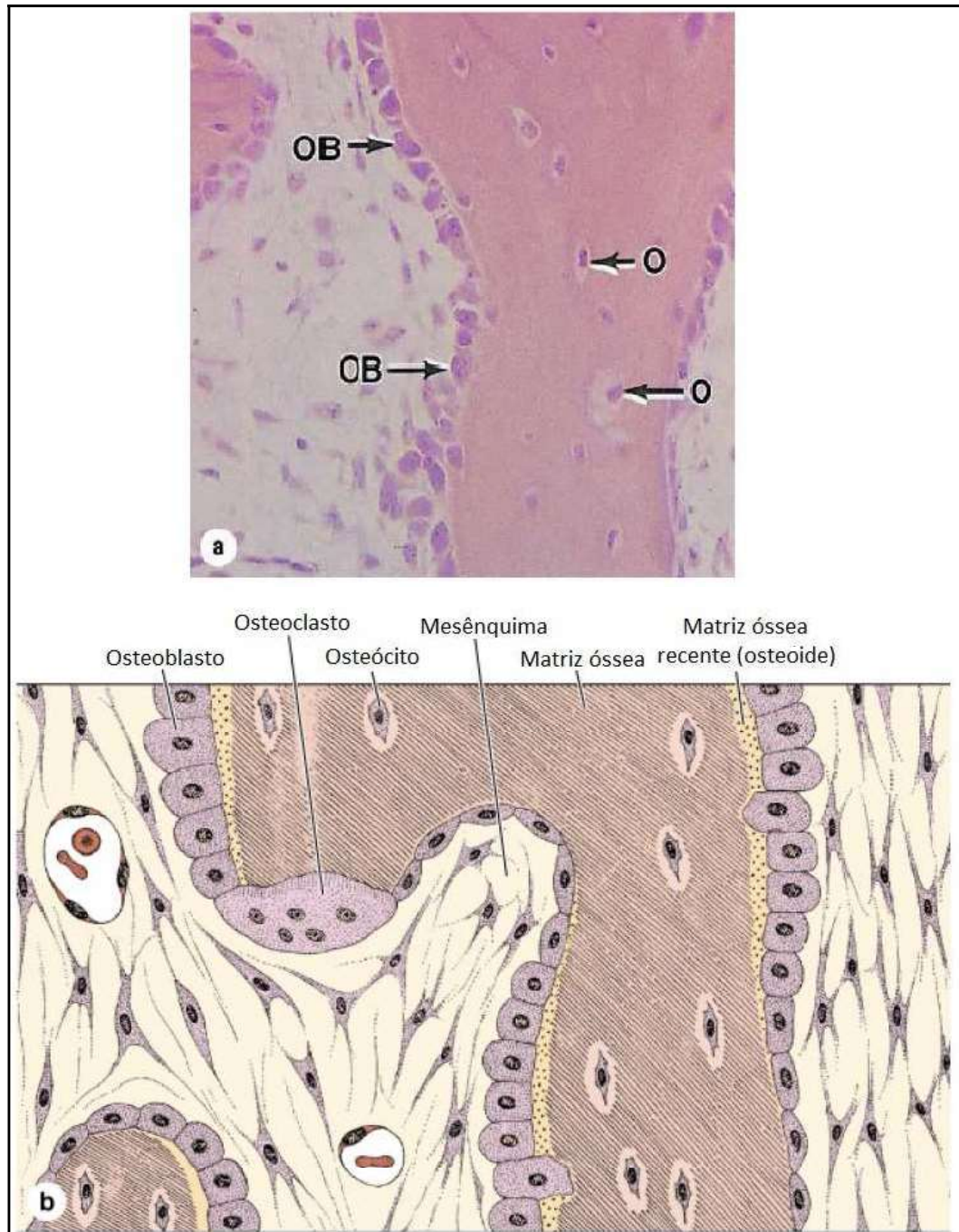


Figura 1. Osteoblastos e osteócitos

(a): Microfotografia do desenvolvimento do osso mostra a localização e as diferenças morfológicas entre osteoblastos (OB) e osteócitos (O). Osteoblastos arredondados, derivados das células mesenquimais vizinhas, aparecem como uma linha simples de células adjacentes a uma camada muito fina de matriz levemente corada que cobre a matriz mais fortemente corada. A matriz levemente corada é osteoide. Osteócitos são menos arredondados e localizados entre as lacunas. X300. H&E.

(b): Diagrama esquemático mostra a relação de osteoblastos para osteoide, matriz óssea e osteócitos.

Fonte: adaptado de Mescher AL: Junqueira's Basic Histologic: Text and Atlas, 12th Edition.

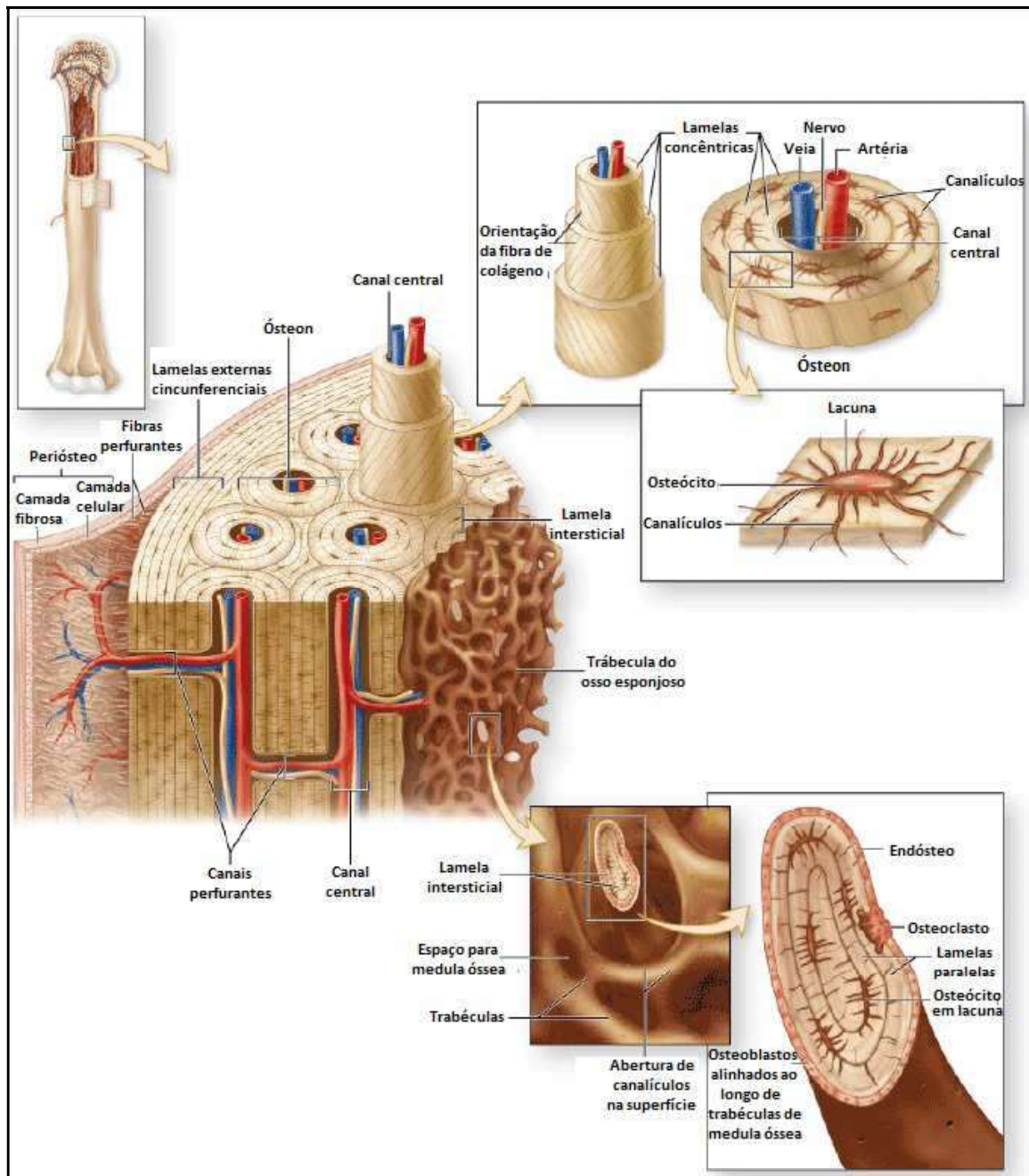


Figura 2. Componentes do osso

Fonte: adaptado de Mescher AL: Junqueira's Basic Histologic: Text and Atlas, 12th Edition.

2.1.2 Formação do tecido ósseo

A homeostase do tecido ósseo depende do equilíbrio na remodelação óssea, ou seja, do balanço entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea, e osteoclastos, células de reabsorção óssea. O ciclo de remodelação óssea consiste basicamente em três fases: reabsorção, reversão e formação.³

O osso é continuamente absorvido em presença de osteoclastos, os quais, em condições normais, estão sempre ativos em cerca de 1% das superfícies ósseas. A absorção óssea ocorre nas áreas adjacentes aos osteoclastos através do envio ao osso de prolongamentos vilosiformes que secretam enzimas proteolíticas – liberadas pelos lisossomos dos osteoclastos – e ácidos, incluindo o cítrico e o láctico. As enzimas digerem ou dissolvem a matriz orgânica do osso, enquanto os ácidos causam a dissolução dos sais ósseos.³ Na destruição do osso pré-formado há a liberação de cálcio iônico (Ca^{++}) e fósforo inorgânico (P_i) para o sangue, além de fragmentos hidrolisados da matriz proteinácea (osteoide). Em geral, os osteoclastos agrupam-se em pequenas massas celulares e ocorre a destruição do osso por cerca de três semanas, escavando um túnel cujo diâmetro varia de 0,2 a 1,0mm e com vários milímetros de extensão. Ao fim desse período, os osteoblastos fazem a deposição de osso durante vários meses, sendo o osso novo depositado em camadas sucessivas sobre as superfícies internas da cavidade até que o espaço seja preenchido. A deposição termina quando o tecido formado começa a comprimir os vasos sanguíneos que suprem a área.³

A remodelagem óssea ocorre continuamente em cerca de dois bilhões de locais distintos e envolve subpopulações de células ósseas, as unidades básicas multicelulares.¹⁹ Normalmente, exceto nos ossos em crescimento e em situações patológicas, a deposição e a reabsorção se equivalem, de modo que a massa óssea não se altera.²

A deposição e a reabsorção contínuas no osso têm várias funções importantes. O osso normalmente ajusta sua força em proporção ao grau de estresse ósseo. Assim, os ossos ficam mais compactados quando submetidos a cargas pesadas. Quando a

matriz óssea se torna velha, fica quebradiça e enfraquecida, havendo a necessidade da formação de uma nova matriz orgânica.³

2.1.3 Tipos de osso

A observação do osso em secção transversal mostra áreas distintas em densidade, uma sem cavidades correspondendo ao osso compacto ou cortical e outras áreas com numerosas cavidades interconectadas, o osso trabecular ou esponjoso. Entretanto, microscopicamente, o osso esponjoso e o trabecular têm a mesma estrutura histológica. Nos ossos longos, as extremidades – epífises ósseas – são compostas por osso esponjoso revestidas de uma fina camada de osso compacto. A porção cilíndrica – diáfise óssea – é praticamente toda composta por osso compacto com uma fina camada de osso esponjoso na face interna em torno da cavidade da medula óssea. Ossos curtos geralmente possuem um núcleo de osso esponjoso rodeado completamente por osso compacto.¹⁸ Há ainda os ossos planos que formam a calota craniana, que são constituídos de osso compacto chamado de placas, separados por uma camada mais espessa de osso esponjoso, o díploe.¹⁸

2.1.4 Regulação hormonal no tecido ósseo

A função das células ósseas é regulada por mecanismos sistêmicos e locais. Os principais reguladores são os hormônios do metabolismo do cálcio: hormônio paratireóideo e vitamina D, além da calcitonina. Ainda, participam outros hormônios que interferem no funcionamento do esqueleto: como os glicocorticoides, hormônios tireoidianos e sexuais.

2.1.4.1 Hormônio paratireóideo (PTH)

O hormônio paratireóideo parece causar absorção de cálcio e fosfato através de efeitos distintos. O efeito mais rápido, com início em poucos minutos resulta da ativação

de células ósseas já existentes, promovendo a absorção de cálcio e fosfato livre (osteólise). O segundo efeito, mais lento, requer vários dias ou semanas para ocorrer plenamente e decorre da proliferação dos osteoclastos, seguida por grande aumento da reabsorção osteoclástica do próprio osso e não apenas da absorção de Ca^{++} e P_i .³

Histologicamente, o PTH produz a remoção de sais ósseos da matriz óssea nas proximidades de osteócitos (no interior do osso), e nas adjacências de osteoblastos (na superfície óssea). O principal efeito do hormônio é a ativação dos osteoclastos, que tem como tarefa a digestão do osso ao longo de meses.¹⁹

O aumento da atividade da glândula paratireoide causa uma rápida absorção dos sais de cálcio presentes nos ossos, acarretando aumento da concentração de cálcio no líquido extracelular e aumento na perda urinária de fosfato através da diminuição da reabsorção de P_i pelos túbulos renais. Ocorre, ainda, a reabsorção renal de cálcio, impedindo a perda contínua do mineral pela urina. Inversamente, a hipofunção da glândula causa hipocalcemia, frequentemente associada com tetania.³

2.1.4.2 Calcitonina

O hormônio calcitonina tem função inversa à ação do hormônio paratireoide. Ele diminui a concentração sanguínea dos íons de cálcio. Nos seres humanos, ele é secretado pelas células parafoliculares, ou células C, da glândula tireoide. A calcitonina reduz a concentração plasmática de cálcio através de dois mecanismos: (i) reduz as atividades de absorção dos osteoclastos, provocando deslocamento no equilíbrio no sentido de deposição de cálcio nos ossos e (ii) impede a formação de novos osteoclastos. Entretanto, nos indivíduos adultos, como as taxas de deposição e absorção de cálcio são pequenas, não ocorre um forte estímulo para a atividade deste hormônio.³

2.1.4.3 1,25-di-hidroxivitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$]

A vitamina D é, na realidade, um pró-hormônio que precisa sofrer duas reações de hidroxilação no fígado e nos rins para se transformar em sua forma ativa 1,25-di-

hidroxivitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$]. A transformação da vitamina D encontra-se esquematizada na Figura 3. A vitamina D desempenha papel decisivo na absorção do Ca^{++} e, em menor grau, na absorção do P_i pelo intestino delgado e também regula a remodelação óssea e a reabsorção renal de Ca^{++} e P_i . Os níveis séricos de cálcio ionizado devem ser mantidos dentro de uma estreita faixa de variação, e qualquer tendência à variação e/ou mudança na atividade das glândulas paratireoides, desencadeia reações com o objetivo de manter a calcemia. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ atua na regulação de expressão de genes em seus tecidos alvos, que incluem o intestino delgado, os ossos, os rins e as glândulas paratireoides.¹⁹

Os raios ultravioletas B convertem o 7-de-hidrocolesterol em vitamina D3 (colecalciferol) nas camadas basais da pele. A vitamina D3 é considerada um secosteroide, uma classe de esteroides que possui um dos anéis de colesterol aberto. A vitamina D2 é produzida por plantas. Tanto a vitamina D3 quanto a D2, sendo esta em menor proporção, são absorvidas pelo trato digestório e são igualmente efetivas após sua conversão em formas ativas. Os laticínios são enriquecidos com vitamina D3, mas nem todos toleram esses produtos. Algumas pessoas como idosos, institucionalizados, que vivem em altas latitudes, que possuem elevada quantidade de melanina na pele ou que não se expõe aos raios ultravioletas e não consomem laticínios correm maior risco de desenvolver deficiência de vitamina D3.²⁰

A vitamina D e seus metabólitos circulam no sangue ligados principalmente à proteína ligadora de vitamina D (DBP). Cerca de 85% da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ circula ligada a essa proteína, 0,4% circula como hormônio livre e o restante ligada a outras proteínas. A DBP transporta a vitamina D altamente lipofílica pelo sangue e se constitui um reservatório de vitamina D que protege o indivíduo contra a deficiência dessa vitamina.¹⁹

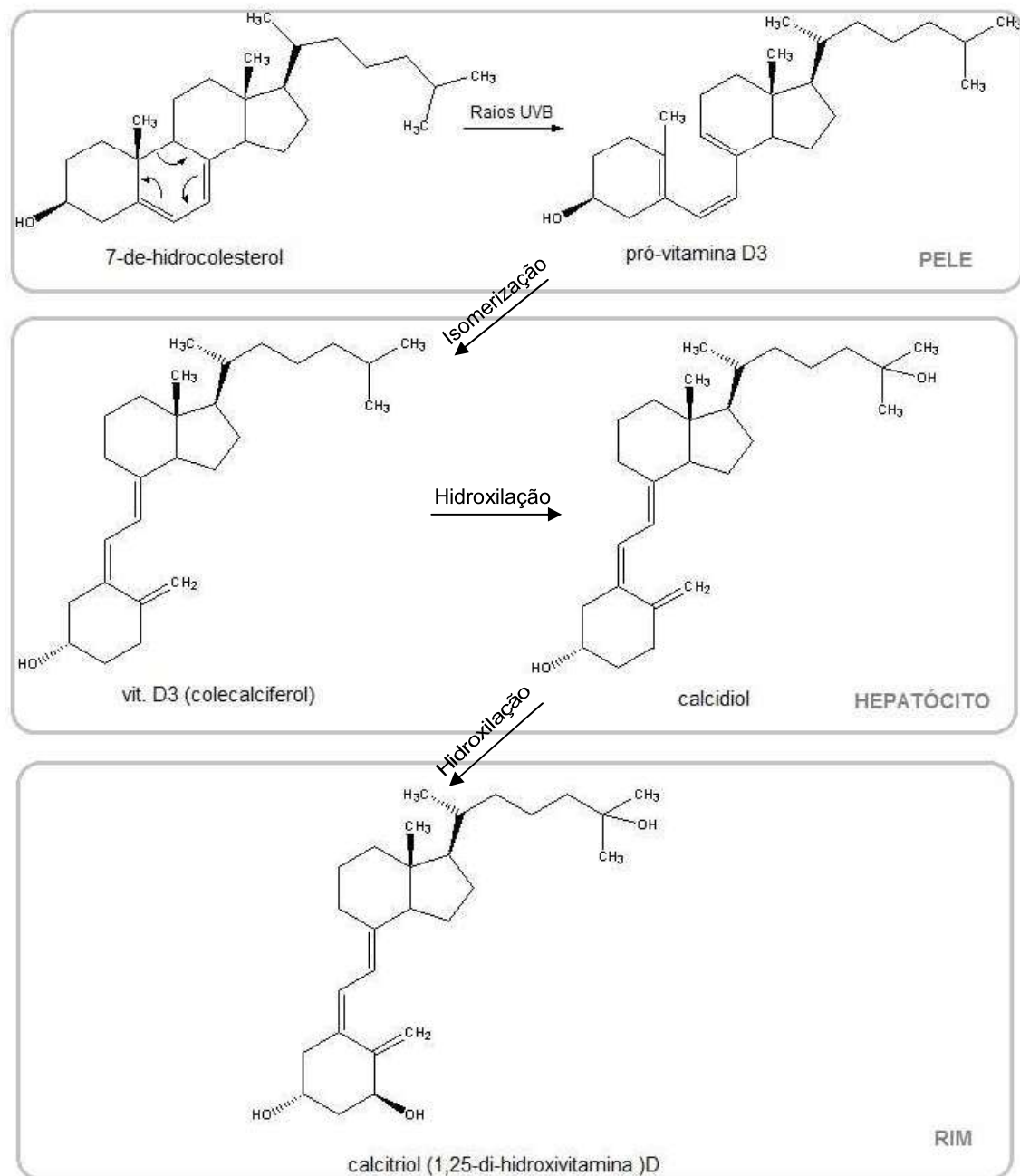


Figura 3. Transformação de ativação da Vitamina D

Fonte: adaptado de Robert Allen, 2010. Wikimedia Commons.

2.1.4.4 Glicocorticoides

Os hormônios glicocorticoides, como o cortisol, promovem a reabsorção óssea e a perda renal de Ca^{++} e inibem a absorção intestinal deste íon. A terapia crônica com glicocorticoides também promove a apoptose de osteoblastos e osteócitos.²¹

Pacientes tratados com altas doses de glicocorticoides (ex. drogas antiinflamatórias e imunossupressoras) podem apresentar osteoporose induzida por tais substâncias.¹⁹ Porém, tem sido discutido que uma dose mínima de glicocorticoides pode induzir efeitos deletérios nos ossos, já sendo evidenciado que terapia crônica com doses orais diárias de 7,5 mg ou mais de prednisona está associada com o aumento do risco de fraturas de vértebras e quadril. Quando o tratamento com glicocorticoides é interrompido, o osso não é capaz de repor a massa óssea perdida e é impossível reconstruir a microarquitetura óssea.²¹

2.1.4.5 Estrogênios

Na mulher não grávida normal, os estrogênios são secretados em quantidades significativas somente pelos ovários, embora quantidades muito pequenas sejam secretadas pelos córtices suprarrenais. Apenas três estrogênios se encontram presentes de forma significativa nas mulheres: o β -estradiol, a estrona e o estriol, representados na Figura 4.²²

Os estrogênios causam aumento da atividade osteoblástica. Na puberdade, quando a mulher entra no período reprodutivo, sua estatura aumenta rapidamente durante alguns anos. Entretanto, os estrogênios também produzem outro efeito, a união precoce das epífises às hastes dos ossos longos, fazendo cessar o aumento de estatura.²²

Dos estrogênios, o β -estradiol é um dos reguladores mais potentes das funções osteoblásticas e osteoclásticas, possui papéis anabólicos e calciotrópicos sobre os ossos, além de estimular a absorção intestinal de Ca^{++} . Os estrogênios promovem a sobrevivência dos osteoblastos e a apoptose dos osteoclastos, favorecendo a formação óssea em detrimento de sua reabsorção. Em mulheres na fase de menopausa, a

deficiência de estrogênios leva a uma fase inicial de perda óssea rápida que dura cerca de 5 anos, seguida por uma fase em que a perda óssea se torna mais lenta que provoca hipocalcemia em razão da absorção ineficiente de Ca^{++} e da perda renal deste íon.¹⁹

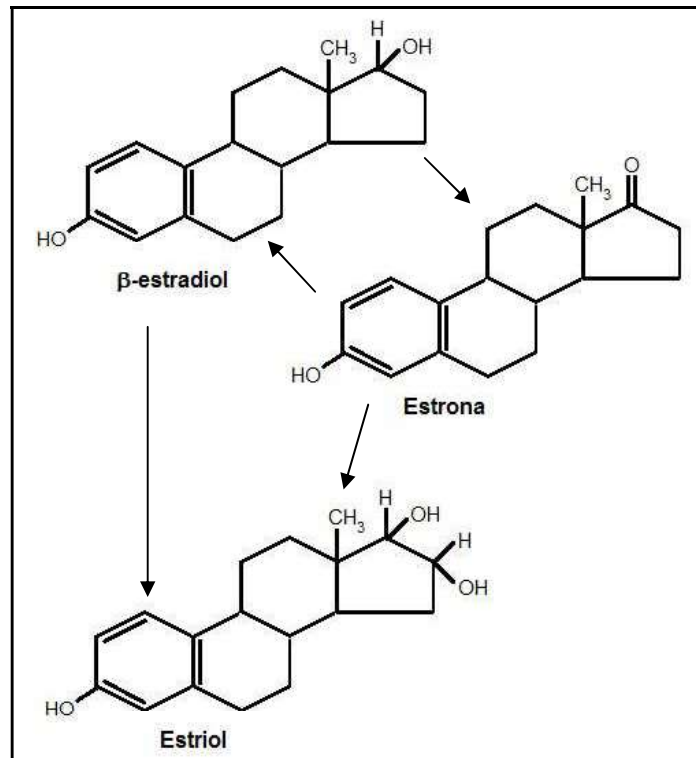


Figura 4. Fórmulas químicas dos principais estrogênios

Fonte: adaptado de Hall, JE; 2011.

2.2 MENOPAUSA

A menopausa é um evento fisiológico definido como o fim do período reprodutivo na mulher. Este evento representa a cessação permanente da menstruação resultante da perda da função folicular ovariana, geralmente devido ao processo de envelhecimento.²³

Entre 40 e 50 anos de idade, o ciclo menstrual geralmente torna-se irregular e a ovulação muitas vezes não ocorre, sendo este período denominado climatério. Depois de alguns meses a alguns anos, o ciclo cessa totalmente e os hormônios femininos caem bruscamente, marcando a menopausa. A causa da menopausa é o

“esgotamento” dos ovários. Durante toda a vida reprodutiva da mulher, cerca de 400 folículos primordiais crescem em folículos maduros e ovulam, e centenas de milhares de oócitos se degeneram. Em torno dos 45 anos de idade, poucos folículos primordiais continuam a ser estimulados por homônios e a produção de estrogênios pelos ovários diminui à medida que o número desses folículos aproxima-se de zero.²² A menopausa pode ocorrer naturalmente por volta dos 51 anos de idade ou ser induzida por intervenções médicas, como cirurgia, quimioterapia ou radioterapia pélvica.²³

Com a diminuição da produção de estrogênios no climatério e com a menopausa, em consequência da ligação dos estrogênios a receptores de alta afinidade com células ósseas, ocorre uma maior atividade metabólica no tecido ósseo. A deficiência estrogênica também aumenta a sensibilidade ao PTH e, em consequência, o processo de remodelação óssea sofre um desequilíbrio com aumento da reabsorção óssea. Nesta fase, a formação óssea é menor que a reabsorção, elevando o risco de diminuição da massa óssea.²⁴ A ocorrência da osteoporose pelo maior *turnover* ósseo ocasionado pela deficiência estrogênica é suportada por achados de perda de massa óssea nos estágios iniciais da pós-menopausa e de ratas ooforectomizadas.²⁵⁻²⁷ Em estudos realizados com terapia de reposição hormonal em ratas ooforectomizadas, observou-se que os estrogênios possuem papel importante na resistência à perda de massa óssea.²⁸⁻³⁰

2.3 OSTEOPOROSE

2.3.1 Caracterização

A osteoporose é a mais comum de todas as osteopatias nos adultos, especialmente em indivíduos com idade avançada, diferenciando-se de outras doenças, como a osteomalácia e a raquitismo, por resultar da diminuição da matriz óssea orgânica, e não da deficiência na calcificação.³ Tal osteopatia é um distúrbio metabólico no qual a reabsorção óssea excede a formação óssea por diminuição da deposição de osteoide, resultado da diminuição da atividade osteoblástica. É caracterizada por baixa

massa óssea com deterioração da microarquitetura do osso, resultando em maior fragilidade do tecido ósseo e aumento do risco de fraturas.¹⁻³

Por ser uma doença comum do metabolismo ósseo, torna-se uma ameaça à saúde das mulheres pós-menopáusicas pela predisposição a um maior risco de fraturas. As fraturas osteoporóticas ocorrem com maior frequência nos sítios onde existem maior proporção de osso trabecular, uma vez que este tipo de osso apresenta uma taxa de remodelação maior em comparação ao osso cortical e, também, é mais suscetível à deficiência estrogênica.^{31,32} As fraturas de vértebras por compressão causam cifose com produção de uma corcunda comum em mulheres idosas com osteoporose.³ As fraturas de quadril nos indivíduos idosos estão associadas à taxa de mortalidade de 12-20%, e metade dos que sobrevivem requerem cuidados prolongados e de alto custo.³³ A ocorrência de fraturas está associada à maior morbidade e mortalidade nas mulheres³⁴, sendo uma doença que apresenta enorme impacto socioeconômico por afetar a qualidade de vida.³⁵

2.3.2 Fisiopatologia

A osteoporose tem múltiplas causas, porém, a forma mais comum é a osteoporose involucional. Os seres humanos normais ganham massa óssea desde o período fetal e se estende durante o crescimento. Após atingir um platô, se inicia a perda óssea à medida que se envelhece. Se acelerada ou exagerada, a perda de massa óssea leva à osteoporose.³³

As mulheres adultas possuem menos massa óssea do que homens adultos e, após a menopausa, perdem-na mais rapidamente que os homens de mesma idade.³³ O pico de massa óssea é atingido até a terceira década de vida.³⁶ No período entre a aquisição do pico de massa óssea e o início da menopausa, a reabsorção e formação óssea encontram-se equilibradas e as alterações na massa óssea tendem a ser mínimas.³⁷ O processo de perda de massa óssea tem seu início ainda antes do período da menopausa, por volta dos 30 anos, mas é com a perda da função ovariana e consequente diminuição da produção de estrogênios, que acontece uma aceleração da perda óssea nos primeiros anos após a menopausa.⁴ O acúmulo de massa óssea até a

maturidade é também influenciado pelo estado hormonal, sendo que os estrogênios parecem ser necessários para a aquisição do pico de massa óssea em homens e mulheres.⁵ O estrogênio inibe a secreção de citocinas, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , as quais contribuem ao desenvolvimento dos osteoclastos. O hormônio também estimula a produção de TGF- β , citocina responsável por aumentar a apoptose dos osteoclastos.³³ Em mulheres pós-menopáusicas, a deficiência de estrogênios está associada à hiperatividade dos osteoclastos e aumento da reabsorção óssea em comparação à formação óssea.³⁸

2.3.3 Diagnóstico

Clinicamente, a osteoporose é diagnosticada quando a densidade mineral óssea (DMO) é reduzida ou quando fraturas por fragilidade óssea ocorrem. As fraturas mais comuns causadas pela osteoporose envolvem coluna lombar e torácica, quadril e porção distal do rádio. Fraturas de vértebras e quadril são de significativo interesse por serem causas consideráveis de morbidade e mortalidade em mulheres idosas.^{21,39}

A densitometria óssea tornou-se amplamente viável como uma ferramenta diagnóstica nos últimos anos. Muitas técnicas para quantificar a DMO vêm sendo desenvolvidas e incluem a absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA), a absorciometria de raios-X de única energia (SXA), a tomografia computadorizada quantitativa (TCQ), o ultrassom quantitativo e a absorciometria radiográfica.²¹

O acesso à DMO por DXA é utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para definir osteopenia e osteoporose. Os critérios são baseados em uma grande quantidade de dados sobre mulheres brancas pós-menopáusicas (Tabela 1).

Tabela 1. Definições de osteoporose para mulheres pós-menopáusicas baseadas nas medidas de DXA, segundo a OMS.⁴⁰

	Definição
T-score	Número de DP acima ou abaixo do pico de massa óssea ("jovem normal") de acordo com a raça
Z-score	Número de DP acima ou abaixo de massa óssea ajustada à idade de acordo com raça e sexo
Normal	DMO T-score ≥ -1
Baixa massa óssea (osteopenia)	DMO T-score < -1 e $> -2,5$
Osteoporose	DMO T-score $\leq -2,5$
Osteoporose severa	DMO T-score $\leq -2,5$ com uma ou mais fraturas por fragilidade óssea

DXA: absorciometria de raios-X de dupla energia; OMS: Organização Mundial da Saúde; DP: desvio-padrão; DMO: densidade mineral óssea.

Fonte: adaptado de Imboden JB: Current Rheumatology Diagnosis & Treatment. 2nd ed. 2007.

A DXA determina DMO em duas dimensões. Os locais mais comumente analisados por DXA são a coluna lombar e o quadril (região entre a projeção óssea do trocânter maior do fêmur e o acetábulo da pelve) para o diagnóstico clínico de osteoporose. A degeneração da coluna vertebral e a calcificação da artéria aorta abdominal pode levar a um falso achado de aumento de DMO por DXA.⁴¹ A TCQ permite a mensuração da densidade óssea volumétrica trabecular sem sobreposição de osso cortical e de outros tecidos, sendo os resultados expressos em miligramas por centímetro cúbico (mg/cm^3) de hidroxiapatita de cálcio.⁴¹ Em contraste, a DXA determina a densidade pela área, mensurada em grama por centímetro quadrado (g/cm^2).⁴²

Ao contrário do método plano da DXA, a TCQ utiliza raio-x em múltiplos ângulos para gerar uma reconstrução de imagem em 3 dimensões do objeto analisado, baseado na absorção de raio-x. Volumes com materiais de grande número de átomos e material denso apresentam maior atenuação de raios-x e aparecem mais brilhantes em imagens de TCQ. A radiação absorvida por cada parte analisada é traduzida em escala de cinzas, produzindo uma imagem. Cada pixel (menor elemento de imagem) da imagem corresponde à média da absorção de radiação nos tecidos de uma determinada zona,

expresso em unidades de Hounsfield (UH).⁴³ No entanto, devido a menor dose de radiação, maior viabilidade, simples operação do scanner e menor custo, a DXA em vez da TCQ, se tornou padrão-ouro para a mensuração de DMO na década de 1990.⁴²

2.3.4 Causas

A idade e a baixa massa óssea são os principais fatores de risco para fraturas osteoporóticas. Os fatores de risco que contribuem para a diminuição da massa óssea podem ser classificados em não modificáveis, como hereditariedade, etnia (caucasiana), idade, sexo feminino, além da situação hormonal do indivíduo e, os modificáveis ou ambientais incluem sedentarismo, inadequada ingestão de cálcio, excessivo consumo de álcool e/ou cafeína, tabagismo e baixo peso corporal.⁴⁴

Dentre tais fatores, as causas mais comuns da osteoporose são (i) a falta de estresse físico sobre os ossos em função da inatividade; (ii) desnutrição em grau suficiente que impeça a formação da matriz proteica; (iii) a deficiência de vitamina C, necessária para a formação de osteoide pelos osteoblastos; (iv) falta de produção estrogênica no período pós-menopausa, pois estes hormônios diminuem a atividade e o número de osteoclastos; (v) idade avançada com redução significativa de hormônio do crescimento e outros fatores que impossibilitam o depósito satisfatório da matriz óssea e (vi) uso prolongado de glicocorticoides ou distúrbios na produção de hormônios corticoides, pois essas situações provocam redução na deposição proteica por todo o organismo e aumento no catabolismo de proteínas, além de especificamente deprimir a atividade osteoblástica.³ Sendo assim, fatores como nutrição, atividade física e saúde durante o crescimento afetam o acúmulo de massa óssea e sua manutenção.^{5,37}

2.3.4.1 Efeitos da cafeína no tecido ósseo

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos relacionando a ingestão de cafeína e o metabolismo ósseo. Os efeitos negativos da cafeína sobre o metabolismo ósseo foram primeiramente publicados por Heaney e Recker.⁶ Posteriormente, Massey e colaboradores^{7,8} demonstraram que a ingestão de café aumentou a diurese levando a

uma calciúria aguda provavelmente como resultado da carga de ácidos vindos do café, pois por ser um reservatório de sais, o osso tem grande capacidade de tamponamento pela mobilização dos sais de cálcio para regular a acidose fisiológica.⁴⁵ Outros mecanismos foram também atribuídos aos efeitos da cafeína sobre o metabolismo ósseo. O consumo de cafeína tem sido associado à substituição do leite da dieta^{46,47} e à inibição da absorção de cálcio intestinal.^{6,9,47,48} Estes motivos fizeram com que o consumo de cafeína fosse rapidamente incluído como um fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose. No entanto, trabalhos posteriores questionaram sobre a provável importância da cafeína como um fator contribuinte no processo da doença.⁹

Os estudos epidemiológicos sobre os efeitos da cafeína no osso são realizados, na maioria das vezes, na população feminina.^{10,11} Em estudos iniciais, como o *Framingham* e outros, foi observada associação entre o consumo de cafeína e fraturas de quadril⁴⁹ ou de quadril e de antebraço.⁵⁰ Estudos posteriores, como o *Mediterranean Osteoporosis Study* (MEDOS) e outros, não foram capazes de encontrar associação entre consumo de cafeína e fratura⁵¹ ou estado ósseo.^{52,53} Em trabalho anterior ao presente estudo, avaliamos o consumo de cafeína e cálcio em mulheres climatéricas, e em concordância com outros trabalhos, também não encontramos associação entre o estado ósseo e o alto consumo de cafeína ou baixo consumo de cálcio. No entanto, foi demonstrado que mulheres com baixa massa óssea ou osteoporose instalada consumiam mais alimentos ricos em cálcio que mulheres com densidade óssea normal, sendo este um achado por provável casualidade reversa.⁵⁴

Alguns estudos em animais não foram capazes de demonstrar um efeito negativo definitivo da cafeína no metabolismo ósseo.^{12,13} Tsuang et al.⁵⁵ demonstraram que a cafeína exerceu efeitos negativos sobre o crescimento e a viabilidade celular em uma linhagem de células de osteoblastos. Outros estudos também demonstraram que a cafeína teve efeito deletério sobre o desenvolvimento e crescimento normal do osso.^{14,15}

2.3.4.1.1 Cafeína

A cafeína foi originalmente isolada de grãos de café no ano de 1820. Juntamente com a teobromina e a teofilina, a cafeína é uma metilxantina, um derivado metilado da xantina.⁵⁶ As xantinas são alcaloides comumente utilizadas na farmacologia como estimulantes e broncodilatadores. Entre os alimentos, a cafeína está naturalmente concentrada no café e também é encontrada em folhas de chás e outras plantas.⁵⁷ Os grãos de café torrado tem entre 1 e 2% de cafeína, mas o nível na bebida é altamente dependente do método de preparação e da concentração, variando de 50 a 125mg por xícara de café preparado. As folhas de chá preto contém entre 3 e 4% de cafeína, atingindo em torno de 50mg por xícara. O cacau em pó contém níveis aproximadamente de 0,2% de cafeína. Em uma bebida de cola, a cafeína presente chega, no máximo, a 0,02%, totalizando cerca de 20mg em um copo.⁵⁸

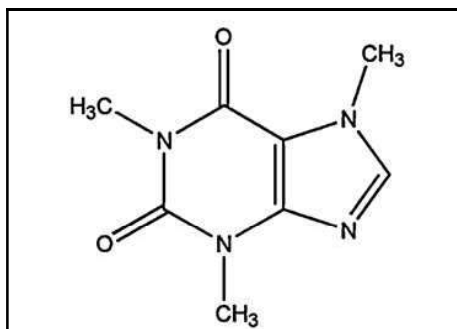


Figura 5. Fórmula química da molécula de cafeína

Fonte: adaptado de Cano-Marquina, A; 2013.

A meia-vida da cafeína é de aproximadamente 4 a 6 horas. É metabolizada primeiramente no fígado, em que o citocromo P450 isoforma CYP1A2 é responsável por cerca de 95% do metabolismo primário. A cafeína age como antagonista dos receptores de adenosina. Há quatro subtipos diferentes de receptores de adenosina, designados adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃.⁵⁹ Além disso, os receptores de adenosina são expressos na maioria dos tecidos, como sistema nervoso central, endotélio vascular, coração, fígado, tecidos adiposo e muscular; consequentemente, há uma gama vasta de respostas possíveis à cafeína.⁵⁷

A expressão e a função dos receptores de adenosina nas células ósseas foram primeiramente demonstradas por Shimegi, que mostrou que a adenosina era mitogênica para uma linhagem celular de osteoblastos (MC3T3-E1).⁶⁰ Foi demonstrada ação mediada por ativação dos receptores de adenosina em osteoblastos e osteoclastos, sendo ainda desconhecidas funções em osteócitos.⁶¹ A ativação de receptores de adenosina é necessária para a formação adequada de complexos específicos de fatores de necrose tumoral em fatores de crescimento ativados por quinases (TRAF6/TAK1) necessários para a ativação de NF- κ B (fator nuclear kappa B), etapa crítica de sinalização na osteoclastogênese.⁶² Foi demonstrado que a ativação da via de sinalização PI3K/AKT por ATP (adenosina trifosfato) estimulou a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos primários de calvárias em ratos, sugerindo que a sinalização poderia desempenhar um papel positivo na modulação da maturação dos osteoblastos.⁶³ Assim, dependendo do receptor de adenosina antagonizado pela cafeína, os efeitos podem ser protetores ou deletérios para a massa óssea.

2.4 MODELO ANIMAL DE OSTEOPOROSE

A maioria das pesquisas sobre a patologia do envelhecimento tem por objetivo compreender as doenças humanas que possuem máxima incidência na velhice. Em função da longevidade humana, os estudos clínicos sobre os fatores que afetam processos como formação ou remodelação óssea podem levar anos ou até décadas para serem concluídos. Assim, a estratégia para seleção de modelos animais consiste em procurar condições patológicas que em algum aspecto se assemelhem às doenças do idoso humano e que possam ser observadas no animal durante um período relativamente curto de tempo.⁶⁴ Kalu¹⁶ definiu um modelo animal de perda óssea pós-menopáusica como um animal vivo em que se possa estudar a perda óssea induzida ou espontânea devido à deficiência hormonal ovariana e, no qual, as características de perda óssea e suas sequelas se assemelhem em um ou mais aspectos às aquelas constatadas em mulheres pós-menopáusicas. O mesmo modelo ainda foi revisado por Wronski & Yen em 1991²⁷ e por Frost & Jee em 1992,⁶⁵ que confirmaram os achados

de Kalu. Existem pelo menos três características que devem estar presentes em um modelo animal: conveniência, pertinência e adequação.⁶⁴ O homem é o único animal que desenvolve osteoporose, embora o esqueleto de todas as espécies pareça perder osso com a idade. Não obstante, existem bons modelos experimentais de diversos aspectos desta doença.⁶⁶⁻⁶⁸

O modelo de ratas ooforectomizadas é considerado adequado para verificar osteoporose na menopausa humana devido às semelhanças em seus mecanismos fisiopatológicos. Em ambas as espécies, a perda de massa óssea é mais rápida após a deficiência de estrogênio. Ainda, tanto em ratos quanto em humanos, ocorre maior perda no osso trabecular que no cortical, a absorção intestinal de cálcio é diminuída e as respostas do esqueleto são semelhantes às ações de prevenção e tratamento da osteoporose.¹⁶ O rato de 12 meses de idade foi escolhido como modelo apropriado devido às características de seus esqueletos (comprimento, peso, densidade e teor de cálcio) apresentarem-se estáveis em um nível próximo ao de ratos envelhecidos.

3 REFERÊNCIAS

1. Lane JM, Lin JT. Osteoporosis: a review. Clin Orthop Relat Res. 2004;425:126–34.
2. Silverthorn DU. Controle endócrino do crescimento e do metabolismo. In: Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5th ed. São Paulo: Artmed; 2010. p. 771–8.
3. Hall JE. Paratormônio, Calcitonina e Metabolismo do Cálcio e Fosfato, Vitamina D, Osso e Dente. In: Tratado de Fisiologia Médica. 12th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 1005–19.
4. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, et al. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. Osteoporos Int. 1998;8(5):468–89.
5. Rizzoli R, Bonjour JP, Ferrari SL. Osteoporosis, genetics and hormones. Mol Endocrinol. 2001;26(2):468–89.
6. Heaney RP, Recker RR. Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. J Lab Clin Med. 1982;99:46–55.
7. Massey LK, Wise KJ. The effect of dietary caffeine on urinary excretion of calcium, magnesium, sodium and potassium in healthy young females. Nutr Res. 1984;4:43–50.
8. Massey LK, Bergman EA, Wise KJ, Sherrard DJ. Interactions between dietary caffeine and calcium on calcium and bone metabolism in older women. J Am Coll Nutr. 1994;13:592–6.
9. Heaney RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. Food Chem. Toxicol. 2002;40:1263–70.
10. Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? Prev Med. 2000;31(5):562–8.
11. Packard PT, Recker RR. Caffeine does not affect the rate of gain in spine bone in young women. Osteoporos Int. 1996;6:149–52.

12. Burdan F, Madej B, Wojtowicz Z, Maciejewski R, Radzikowska E. The effects of short-time caffeine administration on skeleton development in Wistar rats. *Folia Morphol.* 2000;59:91–5.
13. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie T, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, et al. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone.* 2001;28:332–6.
14. Chen HI, Chiang IP. Chronic exercise decreases adrenergic agonist induced vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1996;271:H977–983.
15. Clozel M, Branchaud CL, Tannenbaum GS, Dussault JH, Aranda JV. Effect of caffeine on thyroid and pituitary function in newborn rats. *Pediatr Res.* 1983;17:592–5.
16. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15:175–92.
17. Bandeira F. Fisiologia do osso. In: Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. p. 03–15.
18. Mescher AL. Bone. In: Junqueira's Basic Histology Text & Atlas [Internet]. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2010 [cited 2013 Mar 5]. Available from: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=6180957>
19. Koeppen BM. Regulação Hormonal do Metabolismo do Cálcio e do Fósforo. In: Berne & Levy Fisiologia. 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 707–9.
20. Cozzolino SMF. Nutrientes e osteoporose. In: Biodisponibilidade de nutrientes. 4th ed. Barueri: Manole; 2012. p. 1227–54.
21. Shobak D. Disorders of bone: osteoporosis & glucocorticoid-induced osteoporosis. In: Imboden JB, Hellmann DB, Stone JH. Current Rheumatology Diagnosis & Treatment. 2nd ed. USA: McGraw-Hill; 2007. p. 443–56.
22. Hall JE. Fisiologia Feminina Antes da Gravidez e Hormônios Femininos. In: Tratado de Fisiologia Médica. 12th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 1041–58.
23. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, et al. Executive summary: stages of reproductive aging workshop (STRAW). *Menopause.* 2001;8:402–7.
24. Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Fisiopatologia da osteoporose. In: Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. p. 17–30.

25. Whitcroft SIJ, Stevenson JC. Hormone replacement therapy: risks and benefits. *Clin Endocrinol*. 1992;36:15–20.
26. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989;124:7–16.
27. Wronski TJ, Yen C-F. The ovariectomized rat model as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells Mater*. 1991;(suppl. 1):69–74.
28. Vanin CM, MacLusky NJ, Chachra D, Kasra M, Gryn timer MC, Casper R. Lumbar vertebral density and mechanical properties in aged ovariectomized rats treated with estrogen and norethindrone or norgestimate. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(5):1491–8.
29. Martynetz FA, Biondo-Simões MLP, Martynetz JR, Martynetz TD, Zimmerman E, Mello Neto H. Avaliação tomográfica e tensiométrica de fêmures de ratas ooforectomizadas submetidas à terapia de reposição hormonal. *Rev Bras Ortop*. 2010;45(1):40–5.
30. Wakley GK, Turner RT. Sex steroids and the regulation of bone volume in the rat. *Cells Materials*. 1991;1(Suppl):69–74.
31. National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Panel. Osteoporosis: prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285(6):785–95.
32. Schwartz AV, Kelsey JL, Maggi S, Tuttleman M, Ho SC, Jonsson PV. International variation in the incidence of hip fractures: cross-national project on osteoporosis for the World Health Organization Program for Research on Aging. *Osteoporos Int*. 1999;9(3):242–53.
33. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Hormonal control of calcium & phosphate metabolism & the physiology of bone. In: Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, eds. *Ganong's Review of Medical Physiology* [Internet]. 24th ed. New York: McGraw-Hill; 2012 [cited 2013 May 30]. Available from: <http://www.accesspharmacy.com/content.aspx?aID=56263079>
34. North American Menopause Society (NAMS). Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2010 Feb;17(1):25–54.
35. International Osteoporosis Foundation. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2008;19(4):399–328.

36. Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R. Peak bone mass. *Osteoporos Int.* 1994;4:7–13.
37. US Department of Health and Human Services. Osteoporosis: peak bone mass in women. National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. [Internet]. 2005 [cited 2010 Nov 8]; Available from: http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteoporosis/bone_mass.asp
38. Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: A histomorphometric study in early postmenopausal women. *J. Bone Miner Res.* 1999;14:1217–21.
39. Roush K. Prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women: A review. *Am J Nurs.* 2011;111(8):26–35.
40. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis an assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002;359:1929–36.
41. Li N, Li X, Sun W, Cheng X, Tian W. Comparison of QCT and DXA: osteoporosis detection rates in postmenopausal women. *Int J Endocrinol.* 2013;1–5.
42. Engelke K, Adams JE, Armbrrecht G, Augat P, Bogado CE, Bouxsein ML, et al. Clinical use of quantitative computed tomography and peripheral quantitative computed tomography in the management of osteoporosis in adults: the 2007 ISCD official positions. *J Clin Densitom.* 2008;11(1):123–62.
43. Bauer JS, Mueller DK. Quantitative CT to assess bone mineral density as a diagnostic tool for osteoporosis and related fractures [Internet]. USA: Philips CT Clinical Science. Philips Healthcare; 2013. Available from: http://clinical.netforum.healthcare.philips.com/us_en/Explore/White-Papers/CT/Quantitative-CT-to-assess-bone-mineral-density-as-a-diagnostic-tool-for-osteoporosis-and-related-fractures
44. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, Da Laet C, Dawson A. Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone.* 2000;27(5):585–90.
45. Lemann Jr J, Litzow JR, Lennon EJ. The effects of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest.* 1966;45:1608–14.

46. Wyshak G, Frisch RE. Carbonated beverages, dietary calcium, the dietary calcium/phosphorus ratio, and bone fractures in girls and boys. *J Adolesc Health*. 1994;15:210–5.
47. Heaney RP, Rafferty K. Carbonated beverages and urinary calcium excretion. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:343–7.
48. Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr*. 1993;123:1611–4.
49. Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1990;132:675–84.
50. Hernandez-Avila M, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:157–63.
51. Johnell O, Gullberg B, Kanis JA, Allander E, Elffors L, Dequeker J, et al. Risk factors for hip fracture in European women: the MEDOS Study. Mediterranean Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1802–15.
52. Franceschi S, Schinella D, Bidoli E, Dal Maso L, La Vecchia C, Parazzini F, et al. The influence of body size, smoking, and diet on bone density in pre- and postmenopausal women. *Epidemiology*. 1996;7:411–4.
53. Lloyd T, Rollings N, Eggli DF, Kieselhorst K, Chinchilli VM. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:1826–30.
54. Harter DL, Busnello FM, Dibi RP, Stein AT, Kato SK, Vanin CM. Association between low bone mass and calcium and caffeine intake among perimenopausal women in Southern Brazil: cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. 2013;131(5):In press.
55. Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg Res*. 2006;1:7.
56. Schudt C, Hatzelmann A, Beume R, Tenor H. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;204:01–46.
57. Cano-Marquina A, Tarín JJ, Cano A. The impact of coffee on health. *Maturitas* [Internet]. 2013 [cited 2013 Mar 11]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.02.002>

58. Coultate TP. Compostos prejudiciais. In: Alimentos: a química de seus componentes. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 267–309.
59. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;52(4):527–52.
60. Shimegi S. ATP and adenosine act as amitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Calcif. Tissue Int.* 1996;58(2):109–13.
61. Ham J, Evans BA. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. *Front. Endocrinol.* 2012;18(3):113.
62. He W, Cronstein BN. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. *Purinergic Signal.* 2012;8(2):327–37.
63. Katz S, Ayala V, Santillán G, Boland R. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y2 receptors by extra- cellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;513(2):144–52.
64. Cohen BJ. Introduction. In: Mammalian models for research on aging. Washington D.C.: National Academy Press; 1981. p. 1–6.
65. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Miner.* 1992;18:227–36.
66. Kimmel DB. The oophorectomized beagle as an experimental model for estrogen-depletion bone loss in the adult human. *Cells and Materials.* 1991;(Suppl. 1):75–84.
67. Cohen BJ. Major animal groups for research on aging: carnivores; research use of dogs and cats: skeletal system. In: Mammalian models for research on aging. Washington D.C.: National Academy Press; 1981. p. 190–8.
68. Cohen BJ. Comparative models of selected problems of the human elderly: osteoporosis. In: Mammalian models for research on aging. Washington D.C.: National Academy Press; 1981. p. 358–65.

4 OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito da ingestão de cafeína sobre a massa óssea em um modelo animal de osteoporose.

Específicos

1. Comparar os efeitos da ingestão de cafeína sobre a massa óssea de ratas idosas ooforectomizadas com ratas idosas não ooforectomizadas.
2. Comparar a massa óssea das ratas idosas ooforectomizadas com as das ratas idosas não ooforectomizadas.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em um modelo animal de osteoporose.

O presente artigo foi elaborado conforme as normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.

Efeitos da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em um modelo animal de osteoporose

Effects of caffeine intake on bone tissue in an animal model of osteoporosis

Daniele Lazzarotto Harter¹

Carla Maria De Martini Vanin¹

Sérgio Kakuta Kato¹

Airton Tetelbom Stein¹

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre / Irmandade Santa Casa de
Misericórdia de Porto Alegre

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245 – CEP: 90050-170 - Porto Alegre/RS - Brasil

Auxílio recebido pelo Programa de Apoio à Pós-Graduação – PROAP

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da ingestão de cafeína sobre a massa óssea de ratas envelhecidas ooforectomizadas e intactas.

Métodos: Foram utilizadas 16 ratas Wistar de 16 meses. Os animais foram randomizados em 4 grupos: ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína (Grupo 1: OVX-caf); ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína (Grupo 2: OVX-co); ratas submetidas à operação simulada com ingestão de cafeína (Grupo 3: Sham-caf); e ratas submetidas à operação simulada sem ingestão de cafeína (Grupo 4: Sham-co). Os animais “OVX-caf” e “Sham-caf” receberam cafeína (100 mg/kg de peso corporal) por gavagem durante 10 semanas, os animais dos grupos “OVX-co” e “Sham-co” receberam água como controle. No fim do experimento, foram retiradas as colunas lombares e os fêmures direitos. Foram realizadas medidas dos parâmetros biofísicos e parâmetros quantitativos por densitometria óssea e tomografia computadorizada quantitativa. Os resultados obtidos foram apresentados em médias e desvios-padrão. A comparação entre as médias foi realizada por ANOVA de um fator seguido de teste post-hoc de Tukey. Para efeito estatístico, considerou-se significativo $p \leq 0,05$.

Resultados: Nas avaliações realizadas por tomografia, observou-se diferenças nas regiões de interesse avaliadas na região intratrocanterica ($p=0,021$) no grupo OVX-co com os demais. Foi observada diferença significativa nos pesos dos animais. Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de peso seco, peso úmido, porcentagem de água nos fêmures e colunas, densidade óssea calculada; densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo e área por densitometria óssea e volume.

Conclusão: O consumo de cafeína não alterou a massa óssea das ratas envelhecidas estudadas.

Palavras-chaves: rato, cafeína, osteoporose, ooforectomia, densidade óssea.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effects of caffeine intake on bone mass in aged ovariectomized and intact female rats.

Methods: 16 Wistar female rats of 16 months old were used. The animals were randomly to 4 groups: ovariectomized rats with caffeine intake (Group 1: OVX-caf), ovariectomized rats without caffeine intake (Group 2: OVX-co), rats submitted to sham operation with caffeine intake (Group 3: Sham-caf), and rats submitted to sham operation without caffeine intake (Group 4: Sham-co). The animals “OVX-caf” and “Sham-caf” received caffeine (100mg/kg body weight) by gavage for 10 weeks, the animals of groups “OVX-co” and “Sham-co” received water as a control. At the end of the experiment, the lumbar spines and the right femurs were removed. Measured of biophysical parameters and quantitative parameters by bone densitometry and quantitative computed tomography were made. The results were presented as means and standard deviations. The comparison among four groups was performed by ANOVA one-way followed by post-hoc Tukey test. For statistical effect was considered significant $p \leq 0,05$.

Results: In assessments by tomography, differences were observed in the evaluated regions of interest in the intratrocanteric region ($p = 0.021$) in OVX-co group. Significant differences were observed in body weights of animals. There were no significant differences in the parameters of dry weight, wet weight, percentage of water in femur and columns, calculated bone density, bone mineral density, bone mineral content and area for densitometry and volume.

Conclusion: Caffeine consumption did not change bone mass in aged rats studied.

Key-words: rat, caffeine, osteoporosis, ovariectomy, bone density.

Efeitos da ingestão de cafeína sobre o tecido ósseo em um modelo animal de osteoporose

Effects of caffeine intake on bone tissue in an animal model of osteoporosis

INTRODUÇÃO

A osteoporose é um distúrbio metabólico no qual a reabsorção óssea excede a formação óssea por diminuição da deposição óssea, resultado da diminuição da atividade osteoblástica. É caracterizada por baixa massa óssea com deterioração da microarquitetura do osso, resultando em maior fragilidade do tecido ósseo e aumento do risco de fraturas.¹⁻³ É a doença mais comum do metabolismo ósseo, tornando-se uma ameaça à saúde das mulheres pós-menopáusicas pela predisposição a um maior risco de fratura. As fraturas osteoporóticas ocorrem com maior frequência nos sítios onde existe maior proporção de osso trabecular, uma vez que este tipo de osso apresenta uma taxa de remodelação maior em comparação ao osso cortical e, também, é mais suscetível à deficiência estrogênica.^{4,5}

O pico de massa óssea é atingido até a terceira década de vida.⁶ O processo de diminuição da massa óssea tem seu início ainda antes do momento da menopausa, mas é com a diminuição da produção dos hormônios ovarianos, basicamente o estrogênio, que acontece uma marcada aceleração da perda óssea nos primeiros anos após a menopausa.^{6,7}

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos relacionando a ingestão de cafeína e os efeitos deletérios no tecido ósseo. Os primeiros estudos mostraram efeitos negativos da cafeína sobre o metabolismo ósseo, demonstrando um aumento na diurese levando a uma calciúria aguda; motivos pelos quais, o consumo de cafeína foi rapidamente incluído como um fator de

risco para o desenvolvimento de osteoporose.⁸⁻¹⁰ No entanto, trabalhos posteriores questionaram sobre a provável importância da cafeína como um fator contribuinte no processo da doença.¹¹

Os estudos epidemiológicos sobre os efeitos da cafeína no osso são realizados, na maioria das vezes, na população feminina.^{12,13} Embora alguns estudos não tenham sido capazes de demonstrar um efeito negativo definitivo da cafeína no metabolismo ósseo,¹⁴⁻¹⁶ outros estudos demonstraram que a cafeína causa efeito deletério sobre o desenvolvimento e o crescimento normal do osso.¹⁷⁻¹⁹

O modelo de ratas ooforectomizadas é considerado adequado para verificar osteoporose na menopausa humana devido às semelhanças em seus mecanismos fisiopatológicos. Em ambas as espécies, a perda de massa óssea é mais rápida após a deficiência de estrogênio, que leva a um aumento no processo de remodelação óssea, cuja reabsorção óssea é superior à formação.²⁰ O modelo experimental foi escolhido devido ao maior controle das variáveis, como indução da osteoporose e a quantificação do consumo de cafeína. Em estudos realizados em humanos, o acesso ao consumo dessa substância é de difícil mensuração.^{13,21} O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de cafeína em modelo animal de osteoporose induzida e espontânea, utilizando ratas idosas.

MÉTODOS

ANIMAIS E DELINEAMENTO

Estudo experimental prospectivo realizado com 16 ratas (fêmeas) Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Considerando um nível de significância de 5% e um poder de 80%, tendo por base as especificações do estudo de Shahnazari et al.²², foi calculado um mínimo de 8 ratas por grupo. No entanto devido ao risco de perda por morte por serem

animais envelhecidos, foram adquiridos 10 animais por grupo. Quarenta animais foram obtidos com 4 meses de idade e foram mantidos alojados no biotério da Pós-graduação para chegarem à idade de 12 meses. Aos 15 meses, 15% dos animais já havia morrido, provavelmente devido a infecções de trato respiratório por *Mycoplasma spp.* transmitido verticalmente ou contidos no ambiente. Destes, 46% morreram na recuperação anestésica ou nos primeiros dias após o procedimento cirúrgico, permanecendo 16 animais até o fim do experimento.

O protocolo de pesquisa deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (CEUA/UFCSPA) sob parecer nº 092/11. Foram seguidas as normas contidas no CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences), no Ethical Code for Animal Experimentation da Organização Mundial da Saúde e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Durante o período da pesquisa as ratas foram alimentadas com ração padrão Nuvital para roedores (Nuvilab®) na quantidade de 12g/kg de peso/dia e água *ad libitum*. Foram mantidas em temperatura controlada de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ciclos claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram randomizados aleatoriamente em 4 grupos: ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína (Grupo 1: OVX-caf); ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína servindo de controle ooforectomizado (Grupo 2: OVX-co); ratas submetidas à operação simulada (*sham*-cirurgia) com ingestão de cafeína (Grupo 3: Sham-caf); e ratas submetidas à operação simulada sem ingestão de cafeína, servindo de controle aos animais *sham* operados (Grupo 4: Sham-co).

INTERVENÇÃO CIRÚRGICA

O procedimento cirúrgico nos grupos “OVX” para a realização da ooforectomia bilateral foi realizado segundo a técnica de Khajuria e colaboradores²³ após a anestesia com cetamina (50

mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) por via intraperitoneal. Para a cirurgia simulada dos animais “Sham”, foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico, porém, sem a ligadura de trompas uterinas e retirada de ovários; os ovários apenas foram expostos e recolocados na cavidade abdominal.

Após a cirurgia, as ratas foram alojadas individualmente em caixas de poliuretano forradas com tecido de algodão esterilizadas sobre mesa aquecida até a total recuperação anestésica. Após cinco dias, os animais foram reagrupados em suas gaiolas originais e todos voltaram a ser alimentados normalmente.

ADMINISTRAÇÃO DE CAFEÍNA

Foi administrada por via intragástrica com técnica de gavagem, uma solução de cafeína de 100 mg/kg de peso corporal. A administração da solução com cafeína foi realizada no primeiro, terceiro e quinto dias da semana durante 10 semanas em todos os animais dos grupos “OVX-caf” e “Sham-caf”, seguindo a dose estabelecida por Huang e colaboradores.²⁴ Os animais dos grupos “OVX-co” e “Sham-co” receberam cerca de 1ml de água por gavagem. Todos os animais foram alimentados normalmente com dieta padrão de biotério e água *ad libitum*.

EUTANÁSIA

Após o período de 10 semanas de intervenção, os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) via intraperitoneal e foram decapitados. Após a morte, foi realizada a remoção de fêmur direito e coluna vertebral lombar. A coluna vertebral lombar dos animais foi dissecada *en bloc* (L1-L4) e o fêmur direito foi liberado dos tecidos moles adjacentes.

VARIÁVEIS

Parâmetros biométricos

Peso corporal: O peso dos animais foi verificado em balança digital com precisão de 0,01g no início do experimento, na quinta semana e no dia da morte dos animais para verificar possíveis alterações corporais.

Dimensões do fêmur: O comprimento total e os diâmetros externos maior e menor foram medidos com a utilização de paquímetro digital com precisão de 0,01mm. O comprimento foi medido entre o côndilo distal e a saliência óssea do trocânter maior. Os diâmetros foram realizados entre a diáfise e a epífise, tendo como referência o terceiro trocânter. O diâmetro maior foi medido na posição látero-lateral e o menor, na posição anteroposterior.

Parâmetros biofísicos

Através da utilização de uma balança digital com precisão de 0,0001g, foram obtidos os pesos dos fêmures e das colunas lombares. Foram coletados os pesos úmido (P_u) e seco (P_s) para fêmures e colunas e peso imerso (P_i) para fêmures. Para obter o P_u , os ossos foram mantidos em um dessecador por 12h a fim de retirar o ar presente nos poros, para o P_i , utilizou-se um conjunto de Becker e água destilada onde, após tarado, foram imersos os fêmures. Para o P_s , os ossos foram colocados em uma estufa a 100°C por 24h. Utilizando o princípio de Arquimedes,²⁰ calculou-se o volume ósseo e a seguir, a densidade óssea e o percentual de água nos ossos. Foram utilizadas as fórmulas a seguir:

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

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

$$\text{Percentual de água no osso} = \frac{(P_u - P_s) \times 100}{P_u} \text{ (\%)}$$

Onde:

P_u = peso úmido

P_s = peso seco

P_i = peso imerso

ρ = densidade da água

Parâmetros quantitativos

Densitometria mineral óssea: A absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA) com um densitômetro (Lunar DPX, Lunar®/GE®, USA, 2004) e um software fornecido pelo fabricante (enCORE v.12.0), foram utilizados para aferir a área (expresso em cm^2), conteúdo mineral ósseo (CMO) (expresso em g) e densidade mineral óssea (DMO) (com unidade de medida de g/cm^2) do fêmur e da coluna vertebral lombar na posição anteroposterior dos animais. Foram utilizadas as seguintes especificações no aparelho: modo de leitura fino de 148 linhas, tensão de 76 kV, corrente de 0,375 mA e dose de radiação de 0,5 mrem. As amostras foram colocadas dentro de um recipiente com 4,3 litros de água destilada para simular tecidos moles e ter referência de massa. Todas as amostras foram medidas em duplicata por avaliador cego em semanas alternada e feita a média entre os valores obtidos.

Tomografia computadorizada (TCQ): Foram feitas aquisições das imagens dos fêmures e das colunas dos animais utilizando um tomógrafo com multi detectores de 16 canais (Lightspeed CT 16, General Electric®, USA) empregando aquisições axiais contínuas com espessura de corte de 0,6mm no modo de varredura helicoidal, com nível de energia de 80kV e 50mA. Os dados da tomografia foram transferidos a uma estação de trabalho (Advantage Windows, GE® Healthcare, USA), onde as imagens em cortes coronais dos fêmures e a reconstrução tridimensional dos fêmures e das colunas foram realizadas e analisadas. Para a avaliação da densidade óssea, utilizou-se o eixo coronal de cada fêmur em posição posteroanterior e regiões de interesse (ROIs) foram feitas manualmente em cinco posições: 1) colo do fêmur; 2) trocânter maior; 3) região intratrocantérica; 4) diáfise medial e 5) diáfise lateral. As regiões de colo do fêmur, trocânter maior e região intratrocantérica foram analisadas devido ao maior *turnover* ósseo por serem

formadas principalmente por osso trabecular. As regiões das diáfises, locais com grande proporção de osso compacto, foram analisadas a fim de comparar a intensidade de sinal em unidades de Hounsfield (UH) das imagens de osso compacto com de osso trabecular. Todas as medidas foram feitas em duplicata e utilizou-se a média dos valores encontrados. Devido à baixa resolução das imagens tomográficas com que as vértebras lombares se apresentaram, não foi realizada este tipo de análise. Para as colunas lombares e fêmures estipulou-se o volume de cada peça pela tomografia, expresso em cm^3 .

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS versão 17.0. Os resultados obtidos foram apresentados em médias e desvios-padrão. A comparação entre as médias em cada experimento foi realizada utilizando Análise de Variância de um fator (ANOVA de um fator) seguido de teste post-hoc de comparações múltiplas de Tukey entre os grupos Sham e OVX recebendo a mesma dieta. Para avaliar a interação entre a presença ou ausência de ooforectomia e a presença ou ausência da ingestão de cafeína em relação à média de DMO encontrada, foi utilizado o teste de Análise de Variância Múltipla. Foi realizada análise de coeficiente de variação intraclass (ICC) para as medidas densitométricas e tomográficas realizadas em duplicata. Para efeito estatístico, considerou-se significativo $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Foram analisados os fêmures direitos e colunas lombares de 16 fêmeas de ratos Wistar (*Ratus albinus novergicus*) de 17,5 meses de idade. O experimento ocorreu de fevereiro de 2012

a agosto de 2013, na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e no Centro de Diagnóstico por Imagem do Hospital Dom Vicente Scherer da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Observou-se diferença estatística significativa na média de peso corporal basal dos grupos OVX-co e Sham-co com os grupos OVX-caf e Sham-co ($p = 0,017$) e na média de peso inicial entre OVX-co e Sham-caf com os grupos OVX-caf e Sham-co ($p = 0,015$), respectivamente. A Tabela 1 apresenta as médias e desvios-padrão de peso corporal antes do experimento (basal), no início das intervenções na metade e no fim do experimento. A Figura 1 apresenta o gráfico de pesos corporais dos animais ao decorrer do experimento. A variação de peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais, desde o início até o final da intervenção, está apresentada na Figura 2, na qual é possível observar o menor ganho de peso nos animais que consumiram cafeína, mas sem diferença estatística. As medidas de comprimento, espessura menor e espessura maior dos fêmures estão apresentadas da Tabela 2.

Não foi observada diferença significativa nos parâmetros de peso seco, peso úmido, porcentagem de água nos fêmures e colunas, densidade óssea calculada; DMO, CMO e área por densitometria óssea e volume (Tabela 3). Foi analisado somente o volume realizado pela TCQ devido à maior acurácia dos dados. O ICC foi realizado para cada medida de DMO, sendo 0,994 para os fêmures (IC95%, 0,984-0,998, $p < 0,001$) e 0,965 para as colunas (IC95%, 0,903-0,987, $p < 0,001$).

Nas avaliações de densidade óssea realizadas por TCQ, observou-se diferença estatisticamente significativa nos valores dos ROIs da região intratrocanterica ($p = 0,021$) no grupo OVX-co quando comparado aos demais grupos, resultados na Tabela 4. Foi realizado ICC para as medidas dos ROIs, sendo 0,870 (IC95%, 0,674-0,952, $p < 0,001$) para colo do fêmur, 0,672 (IC95%, 0,297-0,870, $p = 0,001$) para trocânter, 0,905 (IC95%, 0,749-0,966, $p < 0,001$) para

região intratrocantérica, 0,972 (IC95%, 0,922-0,990, $p < 0,001$) para diáfise medial e 0,939 (IC95%, 0,835-0,978, $p < 0,001$) para diáfise lateral.

DISCUSSÃO

No presente estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos pesos corporais dos animais que receberam ou não cafeína. Os animais dos grupos OVX-co e Sham-co apresentaram menor média de peso corporal, provavelmente decorrente do efeito da infecção por *Mycoplasma spp.* Os animais infectados com *M. pulmonis*, na maioria das vezes manifestam a Micoplasmose Respiratória Murina (MRM) que pode causar morbidade e mortalidade importantes, especialmente em animais utilizados em estudos de longa duração ou naqueles com infecção subclínica, que pode ser exacerbada por procedimentos experimentais, principalmente os que deprimem a ventilação ou causem estresse.²⁵ Entretanto, o impacto mais significativo da infecção por *Mycoplasma spp.* deve-se a sua interferência na interpretação dos resultados experimentais obtidos com animais infectados. No animal infectado, estes microorganismos podem alterar a função ciliar e cinética celular, a inflamação neurogênica, a ativação de células NK (natural killer) e a resposta imune local e sistêmica, com indução de diversas interleucinas.²⁶⁻²⁸

O aumento de peso após a intervenção cirúrgica em todos os grupos foi observado. Este fenômeno de ganho de peso em ratos com idade avançada foi observado por Schapira et al.²⁹ O tempo de observação de 10 semanas provavelmente não foi suficiente para identificar o período de diminuição de peso. Sugere-se que para novas pesquisas sobre este tema, o período de acompanhamento seja maior que 10 semanas.

Vários estudos também não mostraram diferença significativa de peso corporal entre os animais que consumiram cafeína e os que não consumiram.³⁰⁻³² No entanto, em um estudo que

avaliou os efeitos da cafeína e do exercício físico em ratos jovens,²⁴ mostrou que tanto a cafeína quanto o exercício físico diminuíram o ganho de peso nos animais ao longo de 10 semanas de tratamento. Em um trabalho realizado por Sakamoto et al.¹⁶ com ratos machos, não foi encontrada diferença significativa de peso corporal entre os grupos que ingeriram cafeína através de café e aqueles que não a receberam, porém, encontrou-se uma tendência de perda de peso após 91 dias do início da intervenção no grupo que recebia café. O efeito da cafeína no peso corporal também foi observado em camundongos jovens que receberam dieta hipercalórica suplementada com cafeína durante 8 semanas, os quais ganharam peso mais lentamente que o grupo controle.³³ Com a ingestão de cafeína, a expressão de adiponectinas aumenta, sendo seus níveis modulados pelo peso corporal e pelo tamanho do tecido adiposo através do mecanismo de regulação por *feedback*.³³ Os efeitos da cafeína sobre a massa corporal também são atribuídos ao aumento do gasto energético por inibição da enzima fosfodiesterase, responsável pela geração de adenosina monofosfato (AMP) a partir de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). O acúmulo de cAMP gerado pela inibição da fosfodiesterase ativa proteínas quinases, que acaba por estimular a lipólise para geração de energia.³⁴

No presente estudo, não foi encontrada diferença estatística no efeito da ooforectomia no ganho de peso dos animais, indo de encontro com os achados de Folwarczna e colaboradores que utilizaram os mesmos grupos experimentais, mas com menor dose de cafeína (20mg/kg de peso) e animais mais jovens (15 a 17 semanas de idade), onde foi encontrado aumento substancial de peso nos grupos ooforectomizados.³⁵ Atribuem-se os achados do presente estudo à idade das ratas que foram utilizadas, entre 16-18 meses de idade, pois ratas entram na menopausa entre 15 e 24 meses de idade.³⁶ Os hormônios sexuais em Wistar fêmeas alcançam o pico até os 12 meses de idade, e o ciclo estral cessa aproximadamente aos 15 meses. Além disso, após os 15 meses existe a desaceleração das modificações de vários parâmetros.²⁹ Sabe-se que os hormônios sexuais

femininos influenciam no depósito de gordura corporal, levando normalmente ao ganho de peso na pós-menopausa. Este efeito foi observado em camundongos *knockout* para receptores de estrogênio α (ER α), em que a eliminação do receptor levou ao aumento da adiposidade visceral, dos níveis de insulina e redução à tolerância à glicose, sugerindo um papel importante do estrogênio no controle do gasto energético.³⁷ Os animais utilizados no presente estudo já se apresentavam em idade aproximada da senescência reprodutiva, assim sendo, a ooforectomia foi realizada para cessar permanentemente os efeitos dos estrogênios gonadais no metabolismo, não causando interferência significativa no peso corporal dos animais já em idade avançada.

Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças significativas nas medidas de comprimento, diâmetros maior e menor nos fêmures direitos das ratas dos diferentes grupos, demonstrando que apesar das diferenças de peso, as medidas não foram significativamente diferentes, criando uma homogeneidade nas mensurações. Entretanto, em estudo realizado com ratas de 45 dias de idade avaliando o efeito do exercício e da cafeína nos ossos observou-se que os animais suplementados com cafeína apresentaram menores massas corporais e femorais, além de maior diâmetro ósseo relativo ao peso corporal que àqueles não suplementados, contudo, não foi verificada interação significativa entre os fatores em nenhum desses parâmetros.³⁸ Devido à idade dos animais no presente estudo, infere-se que a cafeína não pôde alterar a geometria das estruturas ósseas já formadas, diferentemente do que ocorre em animais jovens.

Nas avaliações de densitometria óssea, não foram encontradas diferenças significativas em DMO, CMO e área dos fêmures e colunas. Similarmente aos resultados encontrados, achados de estudo sobre a avaliação de massa óssea de ratas jovens, não foi encontrada diferença estatística no efeito da ingestão de cafeína na mineralização e massa óssea tanto em ratas ooforectomizadas quanto em não ooforectomizadas; ainda, nos ossos longos (fêmur e tíbia) foi observado aumento da mineralização óssea, contrariando os efeitos da deficiência estrogênica.³⁵

A partir da idade de 12 meses, todos os parâmetros de comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio do fêmur já alcançaram um platô, não havendo alterações significativas até os 24 meses de idade, sem ocorrer grande efeito na mineralização de ossos longos.²⁰ No entanto, em outros achados prevalecem os efeitos negativos da cafeína sobre a DMO, principalmente em ossos longos em formação.²⁴ No presente estudo, não se constatou alteração significativa da diminuição de DMO dos fêmures e colunas dos animais, provavelmente porque o método utilizado para essa avaliação não tenha apresentado sensibilidade suficiente para detectar possíveis alterações. Ainda, o número reduzido da amostra se apresenta como potencial limitação do presente estudo.

Os resultados encontrados neste estudo nas avaliações por TCQ sugerem que a porção das metáfises do fêmur de ratos é mais sensível aos efeitos da deficiência estrogênica na remodelagem óssea pela sua maior porção de osso trabecular. Ainda, observou-se que a intensidade de sinal atenuada é muito semelhante nas diáfises femorais em quaisquer grupos, sofrendo pouca influência do *turnover* ósseo em animais maduros. Estes achados sustentam os resultados de Kiebzak e colaboradores,³⁹ que em 1988, realizaram avaliação radiográfica e morfológica dos ossos de ratas como modelo para osteopenia associada à idade, em que foi observada maior perda de osso trabecular na metáfise distal dos fêmures nos animais senescentes. A TCQ permite a mensuração de DMO real, expressa em g/cm³, porém foi utilizada tecnologia convencionalmente aplicada em humanos, e isso pode ter levado a um potencial viés de aferição. No entanto, o mesmo método foi utilizado por Martynetz et al.,⁴⁰ que também utilizaram avaliações de densidade óssea por atenuação de radiação, medidas em UH.

Considerando o efeito da cafeína, em nosso experimento não foi demonstrada diferença significativa na perda óssea dos animais. Porém, a cafeína pareceu proteger os ossos da perda de densidade óssea no grupo ooforectomizado, no entanto, não é possível afirmar com precisão tais achados, como no estudo de Folwarczna et al., no qual foi observado aumento da massa óssea nas

ratas que receberam cafeína.³⁵ Uma limitação do presente estudo que deve ser considerada é a falta de poder estatístico.

Diversos estudos em humanos^{11-13,21} avaliando os efeitos da cafeína sobre o metabolismo ósseo têm enfrentado vários fatores de confusão. Os fatores passam pela dificuldade de determinar a ingestão de cafeína devido à variação do teor de cafeína em produtos comerciais (ex. cafés, chás e refrigerantes) quanto ao relato impreciso de inquéritos alimentares sobre o consumo de cafeína pelos sujeitos da pesquisa. Além disso, há a coocorrência de variáveis de confusão, como a osteoporose, o consumo de cigarros e álcool com a ingestão de cafeína entre as populações estudadas. Embora uma variedade de técnicas estatísticas seja utilizada para identificar e sobrepujar a influência destes fatores, em estudos com animais, tais vieses podem ser controlados com maior precisão.

Para verificar a influência do consumo de cafeína no presente estudo, o ajuste à dose dessa substância administrada nos animais foi realizado para simular o efeito crônico do consumo de cafeína em humanos. As doses utilizadas estão de acordo com outros estudos que avaliaram o efeito da cafeína no tecido ósseo.^{24,41,42} De acordo com estudos prévios, o total de cafeína administrado neste estudo (100mg/kg de peso corporal), é equivalente a aproximadamente 850 mg para um ser humano, equivalente a cerca de 10 xícaras de café.^{16,43} Tal valor é o consumo máximo observado em mulheres por Cooper et al.,⁴⁴ no entanto é cerca de 63% superior ao consumo de mulheres negras observado por Boggs et al.⁴⁵ e 80% superior à ingestão de cafeína observado em mulheres climatéricas por Harter et al.²¹

Os estudos realizados para verificar os possíveis efeitos do café e da cafeína vêm sendo realizados desde o início da década de 1980. No entanto, ainda não foi encontrada uma resposta definitiva para os efeitos no tecido ósseo. Tal lacuna na literatura pode ser devido aos diferentes efeitos antagonista nos receptores de adenosina expressos no tecido ósseo. A expressão e a

função dos receptores de adenosina nas células ósseas foram primeiramente demonstradas por Shimegi, que observou ação mitogênica da adenosina em uma linhagem celular de osteoblastos (MC3T3-E1).⁴⁶ Estudo posterior demonstrou ação mediada por ativação dos receptores de adenosina em osteoblastos e osteoclastos, sendo ainda desconhecidas funções em osteócitos.⁴⁷ A ativação de receptores de adenosina é necessária para a formação adequada de complexos específicos de fatores de necrose tumoral em fatores de crescimento ativados por quinases (TRAF6/TAK1) necessários para a ativação de NF- κ B (fator nuclear kappa B), etapa crítica de sinalização na osteoclastogênese.⁴⁸ Foi demonstrado que a ativação da uma via de sinalização específica (PI3K/AKT) por ATP (adenosina trifosfato) estimulou a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos primários de calvárias em ratos, sugerindo que a sinalização pode desempenhar um papel positivo na modulação da maturação dos osteoblastos.⁴⁹ Assim, os efeitos da cafeína no metabolismo ósseo dependem do receptor de adenosina antagonizado, podendo gerar respostas positivas ou negativas sobre o tecido ósseo.

CONCLUSÃO

A ooforectomia bilateral e a senescência reprodutiva contribuíram para o aumento de peso em ratas envelhecidas.. Neste estudo não foi possível identificar associação entre a cafeína e o efeito deletério sobre a massa óssea de ratas envelhecidas. Um viés que deve ser considerado é a falta do poder estatístico devido às limitações do estudo. Sugerem-se mais estudos translacionais utilizando o consumo crônico de cafeína para mimetizar possíveis alterações na massa óssea na população idosa e, além disso, novas pesquisas em biologia celular para verificar mais efeitos da cafeína nos receptores de adenosina nas células do tecido ósseo.

Agradecimento

Agradecemos ao físico Rodrigo Reginatto do Centro de Diagnóstico por Imagem do Hospital Dom Vicente Scherer da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ao Dr. Paulo Guilherme do Laboratório de Estresse Oxidativo da Universidade Federal de Ciências da Saúde e ao Laboratório de Fisiologia da mesma Universidade.

REFERÊNCIAS

1. Lane JM, Lin JT. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;425:126–34.
2. Silverthorn DU. Controle endócrino do crescimento e do metabolismo. In: *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 5th ed. São Paulo: Artmed; 2010. p. 771–8.
3. Hall JE. Paratormônio, Calcitonina e Metabolismo do Cálcio e Fosfato, Vitamina D, Osso e Dente. In: *Tratado de Fisiologia Médica*. 12th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 1005–19.
4. National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Panel. Osteoporosis: prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285(6):785–95.
5. Schwartz AV, Kelsey JL, Maggi S, Tuttleman M, Ho SC, Jonsson PV. International variation in the incidence of hip fractures: cross-national project on osteoporosis for the World Health Organization Program for Research on Aging. *Osteoporos Int*. 1999;9(3):242–53.
6. Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R. Peak bone mass. *Osteoporos Int*. 1994;4:7–13.
7. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, et al. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int*. 1998;8(5):468–89.
8. Massey LK, Wise KJ. The effect of dietary caffeine on urinary excretion of calcium, magnesium, sodium and potassium in healthy young females. *Nutr Res*. 1984;4:43–50.
9. Massey LK, Bergman EA, Wise KJ, Sherrard DJ. Interactions between dietary caffeine and calcium on calcium and bone metabolism in older women. *J Am Coll Nutr*. 1994;13:592–6.
10. Heaney RP, Recker RR. Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. *J Lab Clin Med*. 1982;99:46–55.
11. Heaney RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol*. 2002;40:1263–70.
12. Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev Med*. 2000;31(5):562–8.
13. Packard PT, Recker RR. Caffeine does not affect the rate of gain in spine bone in young women. *Osteoporos Int*. 1996;6:149–52.
14. Lloyd T, Rollings N, Egli DF, Kieselhorst K, Chinchilli VM. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:1826–30.

15. Johnell O, Gullberg B, Kanis JA, Allander E, Elffors L, Dequeker J, et al. Risk factors for hip fracture in European women: the MEDOS Study. Mediterranean Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 1995;10:1802–15.
16. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie T, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, et al. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone.* 2001;28:332–6.
17. Burdan F, Madej B, Wojtowicz Z, Maciejewski R, Radzikowska E. The effects of short-time caffeine administration on skeleton development in Wistar rats. *Folia Morphol.* 2000;59:91–5.
18. Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1990;132:675–84.
19. Hernandez-Avila M, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:157–63.
20. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15:175–92.
21. Harter DL, Busnello FM, Dibi RP, Stein AT, Kato SK, Vanin CM. Association between low bone mass and calcium and caffeine intake among perimenopausal women in Southern Brazil: cross-sectional study. *Sao Paulo Med J.* 2013;131(5):315–22.
22. Shahnazari M, Martin BR, Legette LL, Lachcik PJ, Welch J, Weaver CM. Diet calcium level but not calcium supplement particle size affects bone density and mechanical properties in ovariectomized rats. *J Nutr.* 2009 Jul;139(3):1308–14.
23. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(3):462–70.
24. Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young wistar rats. *Bone.* 2002;30(1):293–9.
25. Simeka JW, Davis JK, Davidson MK, Ross SE, Stadlander CTK-H, Cassel GH. Mycoplasma diseases of animals. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, eds *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.* Washington: ASM Press; 1992. p. 361–416.
26. Lambert LC, Trummell HQ, Singh A, Cassell GH, Bridges RJ. Mycoplasma pulmonis inhibits electrogenic ion transport across murine tracheal epithelial cell monolayers. *Infect Immun.* 1998;66:272–9.
27. Norlander T, Nilsson L, Rivero C, Midvedt T, Lidegran M, Carlsoo B, et al. Effects of experimental Mycoplasma pulmonis infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat. *Eur Respir J.* 1997;10:2334–42.

28. Swing SP, Davis JK, Egan ML. In vitro effects of *Mycoplasma pulmonis* on murine natural killer cell activity. *Lab Anim Sci*. 1995;45:352–6.
29. Schapira D, Lotan-Miller R, Barzilai D, Silberman M. The rat as a model for studies of the aging skeleton. *Cells Mater*. 1991;1(Suppl. 1):181–8.
30. Ohta M, Cheuk G, Thomas KA, Kamagata-Kiyoura Y, Wink CS, Yazdani M, et al. Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab*. 1999;43:52–9.
31. Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP, Bastos MF. The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density: A histometric study in rats. *Arch oral biol*. 2009;54:717–22.
32. Olchowik O, Chadaj-Polberg E, Tomaszewski M, Polberg M, Tomaszewska M. The influence of caffeine on the biomechanical properties of bone tissue during pregnancy in a population of rats. *Folia histochem cytobiol*. 2011;49(3):504–11.
33. Yun JW, Shin ES, Cho S-Y, Kim S-H, Kim C-W, Lee T-R, et al. The effects of BADGE and caffeine on the time-course response of adiponectin and lipid oxidative enzymes in high fat diet-fed C57BL/6J mice: Correlation with reduced adiposity and steatosis. *Exp Anim*. 2008;57(5):461–9.
34. Dulloo AG. Ephedrine, xanthines and prostaglandin-inhibitors: actions and interactions in the stimulation of thermogenesis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993;17(Suppl. 1):S35–40.
35. Folwarczna J, Pytlik M, Zych M, Cegieła U, Kaczmarczyk-Sedlak I, Nowińska B, et al. Favorable effect of moderate dose caffeine on the skeletal system in ovariectomized rats. *Mol Nutr Food Res*. 2013;[Epub ahead of print].
36. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21:775–7.
37. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, et al. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2501–6.
38. Gomes GJ, Carneiro-Júnior MA, Silva MF, Franco FSC, Marins JCB, Natali AJ. Suplementação com alta dosagem de cafeína não afeta resistência à fratura óssea em ratas submetidas a treinamento de saltos verticais. *Rev Bras Ciênc Esporte (Impr)*. 2010;32(1):201–16.
39. Kiebzak GM, Smith R, Howe JC, Sacktor B. Bone mineral content in the senescent rat femur: an assessment using single photon absorptiometry. *J Bone Miner Res*. 1988;3(3):311–7.
40. Martynetz FA, Biondo-Simões MLP, Martynetz JR, Martynetz TD, Zimmerman E, Mello Neto H. Avaliação tomográfica e tensiométrica de fêmures de ratas ooforectomizadas submetidas à terapia de reposição hormonal. *Rev Bras Ortop*. 2010;45(1):40–5.

41. Glajchen N, Ismail F, Epstein S, Jowell PS, Fallon M. The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. *Calcif Tissue Int.* 1988;43:277–80.
42. Bezerra JP, da Silva LRF, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of high doses of caffeine increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2008;79(12):2356–60.
43. Kleiber M. *The Fire of Life: An Introduction to Animal Energetics.* New York: Wiley; 1961. p. 177–216.
44. Cooper C, Atkinson J, Wahner HW, O’Fallon WM, Riggs BL, Judd HL, et al. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis? *J Bone Miner Res.* 1992;7(4):465–71.
45. Boggs DA, Palmer JR, Stampfer MJ, Spiegelman D, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. Tea and coffee intake in relation to risk of breast cancer in the Black Women’s Health Study. *Cancer Causes Control.* 2010;21(11):1941–8.
46. Shimegi S. ATP and adenosine act as mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Calcif Tissue Int.* 1996;58(2):109–13.
47. Ham J, Evans BA. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. *Front Endocrinol.* 2012;18(3):113.
48. He W, Cronstein BN. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. *Purinergic Signal.* 2012;8(2):327–37.
49. Katz S, Ayala V, Santillán G, Boland R. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y2 receptors by extra- cellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Arch Biochem Biophys.* 2011;513(2):144–52.

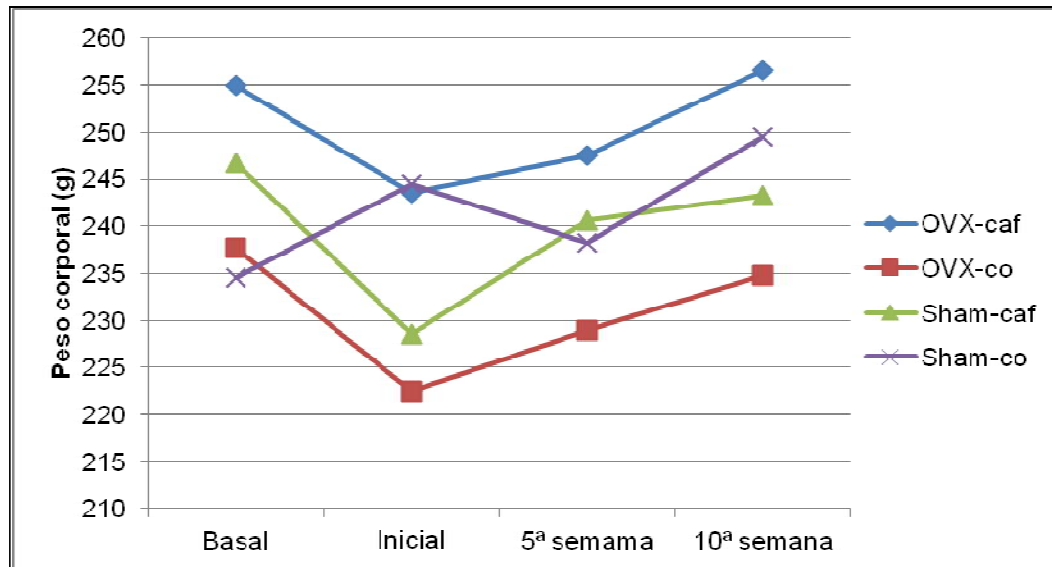


Figura 1. Gráfico linear de variação de peso corporal dos grupos experimentais

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína.

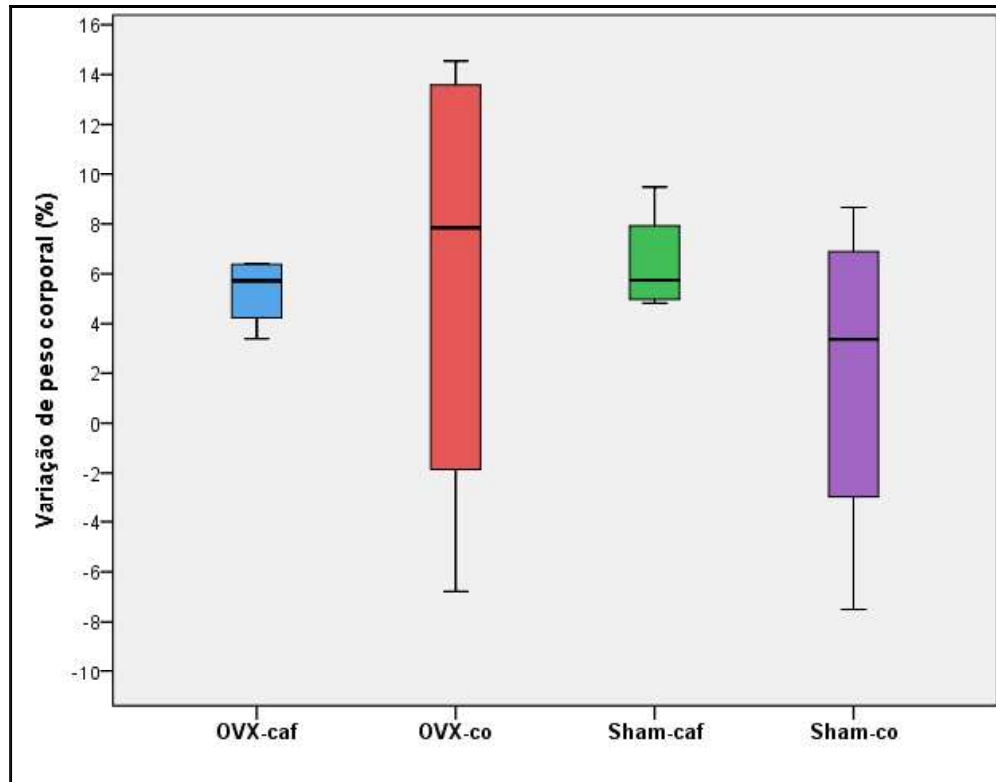


Figura 2. Variação de peso corporal entre o início e o final do experimento entre os grupos que receberam ou não cafeína e que foram ooforectomizados ou sham operados

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína.

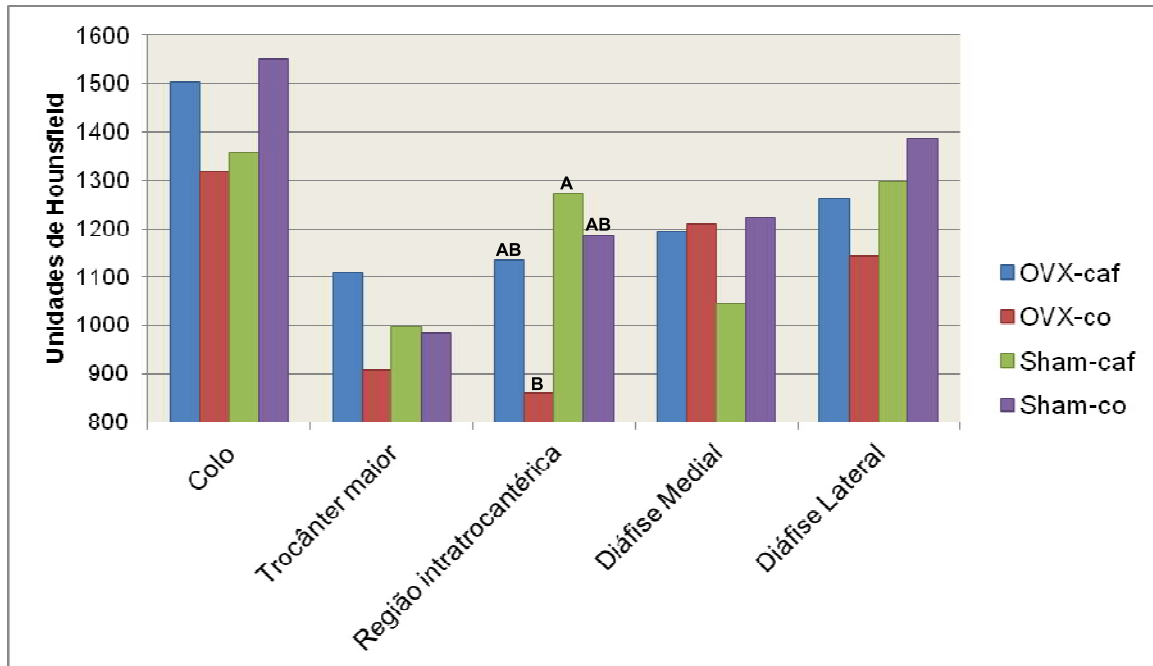


Figura 3. Atenuação radiográfica por Unidades de Hounsfield nas regiões de interesse dos fêmures direitos das ratas dos diferentes grupos experimentais

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância (ANOVA de um fator), utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína.

Tabela 1. Pesos corporais no início, meio e fim do experimento dos diferentes grupos experimentais, em média e desvios padrão.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	OVX-caf (n=4)	OVX-co (n=4)	Sham-caf (n=4)	Sham-co (n=4)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Peso basal (g)	255,00 ^{Aa} ± 9,06	234,75 ^{Ba} ± 10,14	246,50 ^{ABa} ± 8,06	234,50 ^{Ba} ± 7,72
Peso inicial (g)	243,50 ^{Ab} ± 8,70	222,50 ^{Bb} ± 12,79	228,50 ^{ABb} ± 6,19	244,50 ^{Aa} ± 9,15
Peso 5ª semana (g)	247,50 ^{Aab} ± 9,71	229,00 ^{Aab} ± 18,00	240,75 ^{Aa} ± 6,80	238,25 ^{Aa} ± 27,88
Peso 10ª semana (g)	256,50 ^{Aa} ± 12,26	234,75 ^{Aa} ± 13,20	243,25 ^{Aa} ± 8,69	249,50 ^{Aa} ± 22,29

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha e médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem significativamente através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína; DP= desvio-padrão.

Tabela 2. Dimensões de comprimento, espessuras menor e maior dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos experimentais				<i>p</i>
	OVX-caf (n=4)	OVX-co (n=4)	Sham-caf (n=4)	Sham-co (n=4)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Comprimento (mm)	35,02 ± 0,965	35,05 ± 0,595	34,09 ± 0,654	34,75 ± 0,358	0,211
Espessura menor (mm)	3,11 ± 0,079	3,15 ± 0,082	3,02 ± 0,141	3,20 ± 0,026	0,097
Espessura maior (mm)	5,01 ± 0,243	4,97 ± 0,213	5,06 ± 0,172	4,92 ± 0,085	0,765

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína; DP= desvio-padrão; *p*= menor nível de significância para o teste ANOVA de um fator.

Tabela 3. Parâmetros analisados nas vértebras das colunas lombares e fêmures direitos dos animais nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros		Grupos experimentais				p
		OVX-caf (n=4)	OVX-co (n=4)	Sham-caf (n=4)	Sham-co (n=4)	
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Fêmur	Peso úmido (g)	0,6983 ± 0,0289	0,7388 ± 0,0846	0,6600 ± 0,0163	0,7020 ± 0,0292	0,196
	Peso seco (g)	0,4705 ± 0,0246	0,4654 ± 0,0120	0,4496 ± 0,0196	0,4650 ± 0,0294	0,598
	Água (%)	32,62 ± 2,22	36,49 ± 6,05	31,89 ± 1,56	33,73 ± 4,12	0,397
	DMO (g/cm ²)	0,16 ± 0,012	0,15 ± 0,021	0,15 ± 0,033	0,17 ± 0,003	0,834
	CMO (g)	0,35 ± 0,058	0,30 ± 0,000	0,32 ± 0,050	0,32 ± 0,050	0,517
	Área (cm ²)	2,28 ± 0,299	2,18 ± 0,330	2,22 ± 0,465	1,98 ± 0,126	0,602
	Volume (cm ³)	0,696 ± 0,053	0,696 ± 0,032	0,640 ± 0,013	0,694 ± 0,006	0,294
	Densidade óssea (g/cm ³)	1,005 ± 0,041	1,059 ± 0,082	1,030 ± 0,015	1,012 ± 0,035	0,455
Coluna	Peso úmido (g)	1,2454 ± 0,1504	1,3636 ± 0,1490	1,2098 ± 0,1408	1,4491 ± 0,1030	0,103
	Peso seco (g)	0,5693 ± 0,0457	0,5718 ± 0,0615	0,5238 ± 0,0871	0,6164 ± 0,0248	0,236
	Água (%)	54,07 ± 3,13	58,02 ± 2,42	56,78 ± 3,88	57,26 ± 4,18	0,434
	DMO (g/cm ²)	0,15 ± 0,002	0,14 ± 0,004	0,14 ± 0,007	0,14 ± 0,006	0,330
	CMO (g)	0,30 ± 0,000	0,28 ± 0,050	0,30 ± 0,000	0,30 ± 0,000	0,426
	Área (cm ²)	2,12 ± 0,236	1,88 ± 0,263	2,12 ± 0,126	2,05 ± 0,289	0,429
	Volume (cm ³)	1,090 ± 0,109	1,059 ± 0,112	1,027 ± 0,096	1,166 ± 0,085	0,074

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína; DP= desvio-padrão; p= menor nível de significância para o teste ANOVA de um fator; DMO= densidade mineral óssea; CMO= conteúdo mineral ósseo.

Tabela 4. Atenuação de raios-x por Unidades de Hounsfield em Regiões de Interesse dos fêmures direitos dos diferentes grupos experimentais.

ROI do fêmur	Grupos experimentais				<i>p</i>
	OVX-caf	OVX-co	Sham-caf	Sham-co	
	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Colo (UH)	1503,62 ± 120,45	1316,90 ± 233,97	1357,38 ± 176,14	1550,10 ± 303,64	0,406
Trocânter maior (UH)	1107,75 ± 38,78	908,42 ± 109,85	997,38 ± 221,45	981,50 ± 214,31	0,426
Região intratrocanterica (UH)	1135,70 ^{AB} ± 188,99	859,48 ^B ± 157,74	1272,30 ^A ± 163,62	1182,93 ^{AB} ± 138,28	0,021
Diáfise Medial (UH)	1194,98 ± 217,09	1208,63 ± 201,58	1045,18 ± 101,56	1222,58 ± 164,36	0,483
Diáfise Lateral (UH)	1260,18 ± 78,61	1142,48 ± 301,04	1297,00 ± 151,96	1388,18 ± 66,57	0,310

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância (ANOVA de um fator), utilizando o delineamento em medidas repetidas, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

OVX-caf= ratas ooforectomizadas com ingestão de cafeína; OVX-co= ratas ooforectomizadas sem ingestão de cafeína; Sham-caf= ratas “sham”-cirurgia com ingestão de cafeína; Sham-co= ratas “sham”-cirurgia sem ingestão de cafeína; DP= desvio-padrão; *p*= menor nível de significância para o teste ANOVA de um fator; ROI= Região de interesse; UH= unidades de Hounsfield.

ANEXO I – Composição da ração de roedores Nuvital® Nuvilab CR-1**NUVILAB CR-1 Ração para animais de laboratório****COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO:**

Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e BHT.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DE PRODUTO:

Umidade (máx) 125 g/kg

Proteína bruta (mín) 220 g/kg

Extrato etéreo 40 g/kg

Matéria mineral (máx) 90 g/kg

Fibra bruta (máx) 70 g/kg

Cálcio (mín,máx) 10,14 g/kg

Fósforo (mín) 8000 mg/kg

VITAMINAS: vitamina A (mín) 13000 UI/kg, vitamina D3 (mín) 2000 UI/kg, vitamina E (mín) 34 UI/kg, vitamina K3 (mín) 3 mg/kg, vitamina B1 (mín) 5mg/kg, vitamina B2 (mín) 6mg/kg, vitamina B6 (mín) 7mg/kg, vitamina B12 (mín) 22 mcg/kg, niacina (mín) 60 mg/kg, pantetonato de cálcio (mín) 20 mg/kg, ácido fólico (mín) 1mg/kg, biotina (mín) 0,05 mg/kg, colina (mín) 1900 mg/kg. MINERAIS:sódio (mín) 2700 mg/kg, ferro (mín) 50 mcg/kg, manganês (mín) 60 mg/kg, zinco (mín) 60 mg/kg, cobre (mín) 10 mg/kg, iodo (mín) 2 mg/kg, selênio (mín) 0,05 mg/kg, cobalto (mín) 1,5 mg/kg, flúor (máx) 80 mg/kg. AMINOÁCIDOS: lisina (mín) 12 g/kg, metionina (mín) 4000 mg/kg. ADITIVOS: BHT 100 mg/kg.

ANEXO II – Parecer consubstanciado do projeto de pesquisa



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 057/11

Parecer 092/11

2) DATA DO PARECER: 16/11/2011

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeitos da ingestão de cafeína na massa óssea de ratas envelhecidas

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Airton T. Stein

5) RESUMO DO PROJETO:

Estudo sobre o efeito da cafeína sobre o metabolismo ósseo de 40 ratas Wistar de 12 meses de idade randomizadas em 4 grupos: ooforectomia com e sem cafeína, cirurgia semelhante com e sem cafeína. Ingestão de cafeína 3x semana gavage. Análise da densidade mineral óssea por DEXA.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

-Avaliar o efeito da ingestão de cafeína sobre a MO de ratas wistar.
- Comparar o efeito da cafeína sobre a MO de ratas idosas ooforectomizadas com não ooforectomizadas.
-Comparar a perda da MO de ratas idosas ooforectomizadas com a das ratas não ooforectomizadas.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐

Ensino

☒

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒

Adequado

☐

Comentários

Introdução

☒

Adequada

☐

Comentários

Objetivos

☒

Adequados

☐

Comentários

Já existe um modelo experimental para estes objetivos?

Respondido a questão: existe modelo experimental de perda de massa óssea de ratas pós menopausa.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Relevância e Justificativa ☒ Adequados ☐ Comentários
Existem evidências que demonstram que o metabolismo ósseo em ratos é semelhante a humanos? Respondido a questão com duas referências.

Materiais e Métodos ☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa ☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora ☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas ☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B ☐ C ☐ D ☒ E ☐

Justifique:

Uso de anestésico e procedimento cirúrgico de grande porte.

Espécie: Rato **Número Amostral:** 40

Redução Amostral: ☐ Sim ☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: ☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: ☒ Sim ☐ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Melhorar a descrição dos procedimentos cirúrgicos e eutanásia?

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Não está descrito com detalhes

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Origem: biotério UFCSPA

CDI-HDVS.

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Rato	F	40

12) RECOMENDAÇÃO:

☒ Aprovado

☐ Com Pendência

☐ Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 058/11 - Adendo - Parecer 228/13

2) DATA DO PARECER: 11/09/13

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeitos da ingestão de cafeína na massa óssea de ratas envelhecidas

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Airton T. Stein

5) RESUMO DO PROJETO:

Estudo sobre o efeito da cafeína sobre o metabolismo ósseo de 40 ratas Wistar de 12 meses de idade randomizadas em 4 grupos: ooforectomia com e sem cafeína, cirurgia semelhante com e sem cafeína. Ingestão de cafeína 3x semana gavage. Análise da densidade mineral óssea por DEXA.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

-Avaliar o efeito da ingestão de cafeína sobre a MO de ratas wistar.
- Comparar o efeito da cafeína sobre a MO de ratas idosas ooforectomizadas com não ooforectomizadas.
-Comparar a perda da MO de ratas idosas ooforectomizadas com a das ratas não ooforectomizadas.

7) FINALIDADE DO PROJETO: ☐ Ensino ☒ Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título ☒ Adequado ☐ Comentários

Introdução ☒ Adequada ☐ Comentários

Objetivos ☒ Adequados ☐ Comentários

Já existe um modelo experimental para estes objetivos?

Respondido a questão: existe modelo experimental de perda de massa óssea de ratas pós menopausa.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Relevância e Justificativa ☒ Adequados ☐ Comentários
Existem evidências que demonstram que o metabolismo ósseo em ratos é semelhante a humanos? Respondido a questão com duas referências.

Materiais e Métodos ☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa ☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora ☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas ☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C ☐ D ☒ E ☐

Justifique:

Uso de anestésico e procedimento cirúrgico de grande porte.

Espécie: Número Amostral:

Redução Amostral: ☐ Sim ☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: ☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: ☒ Sim ☐ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Melhorar a descrição dos procedimentos cirúrgicos e eutanásia?

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Não está descrito com detalhes

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Origem: biotério UFCSPA

CDI-HDVS.

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Rato	F	40

12) RECOMENDAÇÃO:

☒ Aprovado

☐ Com Pendência

☐ Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Adendo ao projeto em 11/09/13 para inclusão de material biológico.

ANEXO III – Normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia



ISSN 0100-7203 *versão
impressa*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)
- [Envio dos manuscritos](#)
- [Itens para a conferência do manuscrito](#)

Escopo e política

A Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Rev Bras Ginecol Obstet., ISSN 0100 7203), publicação mensal de divulgação científica da Federação das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), é dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins, com o propósito de publicar contribuições originais sobre temas relevantes no campo da Ginecologia, Obstetrícia e áreas correlatas. É aberta a contribuições nacionais e internacionais. A revista aceita e publica trabalhos em português, inglês e espanhol.

O material enviado para análise não pode ter sido submetido simultaneamente à publicação em outras revistas nem publicado anteriormente. Na seleção dos manuscritos para publicação, são avaliadas originalidade, relevância do tema e qualidade da metodologia utilizada, além da adequação às normas editoriais adotadas pela revista. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.

Os manuscritos submetidos à revista são analisados por pareceristas e o sigilo sobre a autoria e a identidade dos revisores é garantido durante todo o processo de edição. Os pareceres dos revisores e as instruções do editor serão enviados para os autores para que eles tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas. Os autores devem reenviar o texto com as modificações solicitadas assim que possível, devendo justificar, na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento de alguma sugestão para modificação. Não havendo retorno do trabalho após três meses, presume-se que os autores não têm mais interesse na publicação. Os autores podem solicitar em qualquer ponto do processo de análise e edição do texto a sustação do processo e a retirada do trabalho. Os conceitos e as declarações contidos nos artigos são de responsabilidade dos autores.

A revista publica contribuições nas seguintes categorias:

1. Artigos Originais, trabalhos completos prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original têm prioridade para publicação.
2. Relatos de Casos, de grande interesse e bem documentados, do ponto de vista clínico e laboratorial. Os autores deverão indicar na carta de encaminhamento os aspectos novos ou inesperados em relação aos casos já publicados. O texto das seções Introdução e Discussão deve ser baseado em revisão bibliográfica atualizada. O número de referências pode ser igual ao dos trabalhos completos.
3. Técnicas e Equipamentos, para apresentação de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos. Valem para essa categoria todas as normas aplicadas para trabalhos completos.
4. Artigos de Revisão, incluindo avaliação crítica e sistematizada da literatura, meta-análises ou revisões sistemáticas. A seleção dos temas e o convite aos autores têm como base planejamento estabelecido pela editoria. Contribuições espontâneas podem ser aceitas. Nesse caso, devem ser enviados inicialmente um resumo ou roteiro do texto, a lista de autores e as respectivas publicações sobre o tema. Se houver interesse da revista, será enviado convite para apresentação do texto definitivo. Todos os autores devem ter publicações em periódicos regulares, indexados sobre o tema da revisão. O número de autores é limitado a quatro, dependendo do tipo de texto e da metodologia empregada. Devem ser descritos os métodos e procedimentos adotados para a obtenção do texto, que deve ter como base referências recentes, inclusive do ano em curso. Tratando-se de tema ainda sujeito a controvérsias, a revisão deve discutir as tendências e as linhas de investigação em curso. Apresentar, além do texto da revisão, resumo, abstract e conclusões. Ver a seção "Preparo do manuscrito" para informações quanto ao texto principal, página de rosto, resumo e abstract;
5. Comentários Editoriais, solicitados pelo editor;
6. Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contados da data de envio do resumo. Devem conter, aproximadamente, 300 palavras e, para serem aceitos, devem seguir as normas da revista quanto à estruturação, à forma e ao conteúdo. Incluir título em português e inglês e, no mínimo, três palavras ou expressões-chave. Não há revisão do texto dos Resumos de Teses. No arquivo enviado, informar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do serviço ou departamento onde a tese foi desenvolvida e apresentada. Lembramos que a publicação do resumo não impede a posterior publicação do trabalho completo em qualquer periódico.

Cartas dos Leitores para o Editor, versando sobre matéria editorial ou não, mas com apresentação de informações relevantes ao leitor. As cartas podem ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos publicados, a carta é enviada aos autores para que sua resposta possa ser publicada simultaneamente.

Forma e preparação de manuscritos

Informações gerais

1. A revista não aceita material editorial com objetivos comerciais.
2. Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que podem influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre essas situações, menciona-se a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou dos equipamentos citados ou utilizados no trabalho, assim como em concorrentes da mesma. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, as consultorias etc.
3. No texto, deve ser mencionada a submissão e a aprovação do estudo por um Comitê de Ética em Pesquisa reconhecido pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).
4. Artigo que trate de pesquisa clínica com seres humanos deve incluir a declaração, na seção Métodos, de que os sujeitos do estudo assinaram o termo de consentimento livre e informado. Os autores devem informar, também, que a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008.
5. No caso de trabalhos envolvendo experimentação animal, os autores devem indicar na seção Métodos que foram seguidas as normas contidas no CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences) Ethical Code for Animal Experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (www.cobea.org.br).
6. Todos os ensaios controlados aleatórios (randomized controlled trials) e clínicos (clinical trials) submetidos à publicação devem ter o registro em uma base de dados de ensaios clínicos. Essa é uma orientação da Plataforma Internacional para Registros de Ensaios Clínicos (ICTRP) da Organização Mundial da Saúde (OMS), e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). As instruções para o registro estão disponíveis no endereço eletrônico do ICMJE (http://www.icmje.org/clin_trialup.htm) e o registro pode ser feito na base de dados de ensaios clínicos da National Library of Medicine, disponível em <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.
7. O número de autores de trabalhos completos e relatos de casos é limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) devem ter os responsáveis especificados. Trabalhos e estudos multicêntricos podem ter número de autores compatível com o número de centros (cada situação será avaliada pela editoria e pelos revisores). Os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados devem ser especificados. Todos os autores devem ter conhecimento do texto enviado para a revista.
8. O conceito de coautoria é baseado na contribuição de cada um, para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados ou que tenham fornecido apenas suporte material não é justificável.
9. Os autores serão informados, por correspondência eletrônica, do recebimento dos trabalhos. Os trabalhos que estiverem de acordo com as Instruções aos Autores e se enquadram na política editorial da revista serão enviados para análise por revisores indicados pelo editor. Os originais em desacordo com os objetivos da revista ou com essas instruções são devolvidos aos autores para as adaptações necessárias antes da avaliação pelo Conselho Editorial ou recusados sem análise por revisores.

10. Junto dos arquivos originais, deve ser enviada uma carta de encaminhamento, na qual deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de copyright para a revista.
11. Para manuscritos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado ou aproximadamente 30.000 caracteres. Limitar o número de tabelas e figuras ao necessário para apresentação dos resultados que são discutidos (como norma geral, limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso, não ultrapassar 15 páginas de texto ou 18.000 caracteres (ver "Preparo do manuscrito", "Resultados").
12. O trabalho deve ser enviado pelo sistema de submissão online no portal SciELO. O endereço eletrônico de todos os autores deve ser fornecido. Desta forma, os coautores receberão informação sobre a submissão do trabalho e, assim, não será necessária a assinatura de todos na carta de encaminhamento. O endereço eletrônico para correspondência com a revista é rbgo@fmrp.usp.br. O arquivo correspondente ao trabalho deve ser único e deve conter texto, referências, tabelas e figuras.

Preparo dos manuscritos

As normas que seguem foram baseadas no formato proposto pelo ICMJE e publicado no artigo "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", atualizado em Outubro de 2008 e disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>.

Apresentação do texto

1. Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página de rosto às referências bibliográficas, tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar ou usar negrito. Numerar todas as páginas, iniciando pela de rosto.
2. Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas ou abreviaturas, descrevê-las por extenso na primeira vez que mencionadas no texto. Iniciar cada seção em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras ou expressões-chave; abstract e keywords; texto; agradecimentos; referências; tabelas individuais e legendas das figuras.

Página de rosto

Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores sem abreviaturas; endereços eletrônicos válidos de todos os autores (opcional, em substituição à carta de encaminhamento); nome da instituição onde o trabalho foi desenvolvido; afiliação institucional dos autores; informações sobre auxílios recebidos sob forma de bolsas de estudos, financiamento, fornecimento de drogas, reagentes ou equipamentos. Obrigatoriamente deve ser fornecido o endereço da instituição onde o trabalho foi desenvolvido, o qual é publicado na página inicial do trabalho. Devem ser indicados nome, endereço, telefone/fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deve ser enviada. Essas informações pessoais são empregadas

apenas para correspondência com a revista e somente são publicadas se houver pedido do(s) autor(es).

Resumo

O resumo do trabalho deve aparecer na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado, que deve ser dividido em seções identificadas: objetivo, métodos, resultados e conclusões. Deve ter aproximadamente 300 palavras. O resumo deve conter as informações relevantes, permitindo que o leitor tenha uma ideia geral do trabalho. Deve incluir descrição resumida de todos os métodos empregados e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes, e não apenas indicação de significância estatística. As conclusões devem ser baseadas nos resultados do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no resumo.

Abaixo do texto do resumo indicar o número de registro e/ou identificação para os ensaios controlados aleatórios e ensaios clínicos (ver item 5 das "Informações Gerais").

Na mesma página do resumo, citar pelo menos três palavras ou expressões-chave que serão empregadas para compor o índice anual da revista. Devem ser baseadas nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

O abstract deve ser versão fiel do texto do resumo estruturado (purpose, methods, results e conclusions). Deve ser também acompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave (keywords). O resumo e o abstract dos Relatos de Casos e dos Artigos de Revisão e de Atualização não devem ser estruturados e são limitados a 150 palavras.

Introdução

Repetir, na primeira página da introdução, o título completo em português e inglês. Nessa seção, mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos, apresentar um resumo dos casos já publicados, epidemiologia da condição relatada e uma justificativa para a apresentação como caso isolado. Expor claramente os objetivos do trabalho.

Métodos

Iniciar essa seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou Grupo Experimental, inclusive dos Controles. Identificar os equipamentos e reagentes empregados (fabricante, cidade e país). Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada, indicar as referências, além da descrição resumida do método. Descrever também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado.

Os trabalhos que apresentam como objetivo a avaliação da eficácia ou a tolerabilidade de tratamentos ou drogas devem, necessariamente, incluir Grupo Controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos desse tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline - Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials (http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html). Ver também itens 4 e 5 das "Informações Gerais".

Resultados

Apresentar os resultados em sequência lógica, no texto, nas tabelas e nas figuras. Expor os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que são discutidos. Não repetir no texto dessa seção todos os dados das tabelas e figuras, mas descrever e enfatizar os mais importantes, sem interpretação dos mesmos (ver também "Tabelas"). Nos Relatos de Casos, as seções "Métodos" e "Resultados" são substituídas pela "Descrição do caso", mantendo-se as demais.

Discussão

Devem ser realçadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionados nas seções "Introdução" e "Resultados". Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Comparar e relacionar suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as diferenças. Explicar as implicações dos achados, suas limitações e fazer as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. As informações sobre os casos já publicados podem ser tabuladas e exibidas nessa seção para comparações.

Agradecimentos

Dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou para aquelas que tenham provido apoio material.

Referências

Todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numerar as referências bibliográficas por ordem de entrada no trabalho e usar esses números para as citações no texto. Evitar número excessivo de referências, selecionando as mais relevantes para cada afirmação e dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregar citações de difícil acesso, como resumos de trabalhos apresentados em congressos, teses ou publicações de circulação restrita (não indexados). Não empregar referências do tipo "observações não publicadas" e "comunicação pessoal". Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão: "aceito e aguardando publicação" ou "in press", indicando-se periódico, volume e ano. Trabalhos aceitos por periódicos que estejam disponíveis online, mas sem indicação de fascículos e páginas, devem ser citados como "ahead of print". Outras publicações dos autores (autocitação) devem ser empregadas apenas se houver necessidade clara e forem relacionadas ao tema. Nesse caso, incluir entre as referências bibliográficas apenas trabalhos originais publicados em periódicos regulares (não citar capítulos ou revisões).

O número de referências bibliográficas deve ser aproximadamente 35. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas.

Para todas as referências, citar os autores até o sexto. Se houver mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme os seguintes modelos:

Formato impresso

- Artigos em revistas

Ceccarelli F, Barberi S, Pontesilli A, Zanca S, Ranieri E. Ovarian carcinoma presenting with axillary lymph node metastasis: a case report. Eur J Gynaecol Oncol. 2011;32(2):237-9.

Jiang Y, Brassard P, Severini A, Goleski V, Santos M, Leamon A, et al. Type-specific prevalence of Human Papillomavirus infection among women in the Northwest Territories, Canada. J Infect Public Health. 2011;4(5-6):219-27.

- Artigos com título em inglês e texto em português ou outra língua

Utilizar o título em inglês, entre colchetes e no final da referência, indicar a língua na qual o artigo foi publicado.

Prado DS, Santos DL. [Contraception in users of the public and private sectors of health]. Rev Bras Ginecol Obstet. 2011;33(7):143-9. Portuguese.

Taketani Y, Mizuno M. [Application of anti-progesterone agents for contraception]. Rinsho Fujinka Sanka. 1988;42(11):997-1000. Japanese.

- Livro

Baggish MS, Karam MM. Atlas of pelvic anatomy and gynecologic surgery. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006.

- Capítulos de livro

Picciano MF. Pregnancy and lactation. In: Ziegler EE, Filer LJ, editors. Present knowledge in nutrition. Washington (DC): ILSI Press; 1996. p. 384-95.

Formato eletrônico

Apenas para informações estatísticas oficiais e citação de referências de periódicos não impressos. Para estatísticas oficiais, indicar a entidade responsável, o endereço eletrônico, o nome do arquivo ou entrada. Incluir o número de tela, data e hora do acesso. Termos como "serial", "periódico", "homepage" e "monography", por exemplo, não são mais utilizados. Todos os documentos devem ser indicados apenas como [Internet]. Para documentos eletrônicos com o

identificador DOI (Digital Object Identifier), este deve ser mencionado no final da referência, além das informações que seguem:

Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de Saúde. Estatísticas vitais. Mortalidade e nascidos vivos: nascidos vivos desde 1994. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. [citado 2007 Fev 7]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>.

- Monograph on the Internet or e-book

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available at: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Tabelas

Apresentar as tabelas em páginas separadas, com espaço duplo e preferencialmente fonte Arial 8. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Todas as tabelas devem ter título e todas as colunas da tabela devem ser identificadas com um cabeçalho. A legenda deve conter informações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (tab) e não o espaçador para separar as colunas e, para nova linha, a tecla enter. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.

Figuras (gráficos, fotografias e ilustrações)

As figuras devem ser apresentadas em páginas separadas e numeradas sequencialmente, em algarismos arábicos, conforme a ordem de aparecimento no texto. Todas as figuras devem ter qualidade gráfica adequada e apresentar título e legenda. Para evitar problemas que comprometam o padrão da revista, o processo de digitalização de imagens (scan) deve obedecer aos seguintes parâmetros: para gráficos ou esquemas, usar 300 dpi/bitmap para traço; para ilustrações e fotos (preto e branco), usar 300 dpi/RGB ou grayscale. Em todos os casos, os arquivos devem ter extensão .tif e/ou .jpg. Também são aceitos arquivos com extensão .xls (Excel), .eps, .psd para ilustrações em curva (gráficos, desenhos e esquemas). São aceitas, no máximo, cinco figuras. Se as figuras já tiverem sido publicadas, devem vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor e constando a fonte na legenda da ilustração.

Legendas

Digitar as legendas usando espaço duplo, acompanhando as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações). Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a cada figura, e na ordem em que foram citadas no trabalho.

Abreviaturas e siglas

Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu nome por extenso. As abreviaturas e as siglas não devem ser usadas no título dos artigos e nem no resumo.

Envio dos manuscritos

O trabalho deve ser enviado pelo sistema de submissão online no portal SciELO <http://submission.scielo.br/index.php/rbgo/login>.

Outras correspondências deverão ser enviadas para:

Jurandyr Moreira de Andrade
Editor

Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia - Editoria - Avenida Bandeirantes, 3.900, 8º andar
- Campus Universitário - CEP 14049-900 - Ribeirão Preto (SP) - Fone: (16) 3602-2803 - Fax:
(16) 3633-0946 - E-mail: rbgo@fmrp.usp.br.

Itens para a conferência do manuscrito

Antes de enviar o manuscrito, conferir se as Instruções aos Autores foram seguidas e verificar o atendimento dos itens listados a seguir:

1. carta de encaminhamento assinada por todos os autores (escaneada e anexada como documento suplementar ou enviada pelo correio) ou informação dos endereços eletrônicos válidos de todos os autores na página de rosto;
2. citação da aprovação do projeto do trabalho por Comissão de Ética em Pesquisa, assinatura do termo de consentimento livre e informado (na seção "Métodos") e informação sobre o atendimento das exigências para pesquisa em animais;
3. número ou código do registro do estudo, se necessário, na página de rosto (item 5 das "Informações Gerais");
4. conflito de interesses: informar se há ou não. Se houver, explicar sem omissão de informações relevantes;
5. página de rosto com todas as informações solicitadas;
6. resumo e abstract estruturados e compatíveis com o texto do trabalho;
7. três ou mais palavras-chave relacionadas ao texto e respectivas keywords baseadas no Decs;
8. verificar se todas as tabelas e figuras estão corretamente citadas no texto e numeradas, e se as legendas permitem o entendimento das mesmas;]

9. Referências bibliográficas: numeradas na ordem de aparecimento e corretamente digitadas. Verificar se todos os trabalhos citados estão na lista de referências e se todos os listados estão citados no texto.

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

 Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Av. das Américas, 8445, sala711 - Barra da Tijuca
22793-081 - Rio de Janeiro RJ - Brasil
Tel.: (55 21) 2487-6336
Fax: (55 21) 2429-5133**



publicações@febrasgo.org.br

APÊNDICE I – Cirurgia de ooforectomia bilateral realizada nas ratas dos grupos OVX-co e OVX-caf

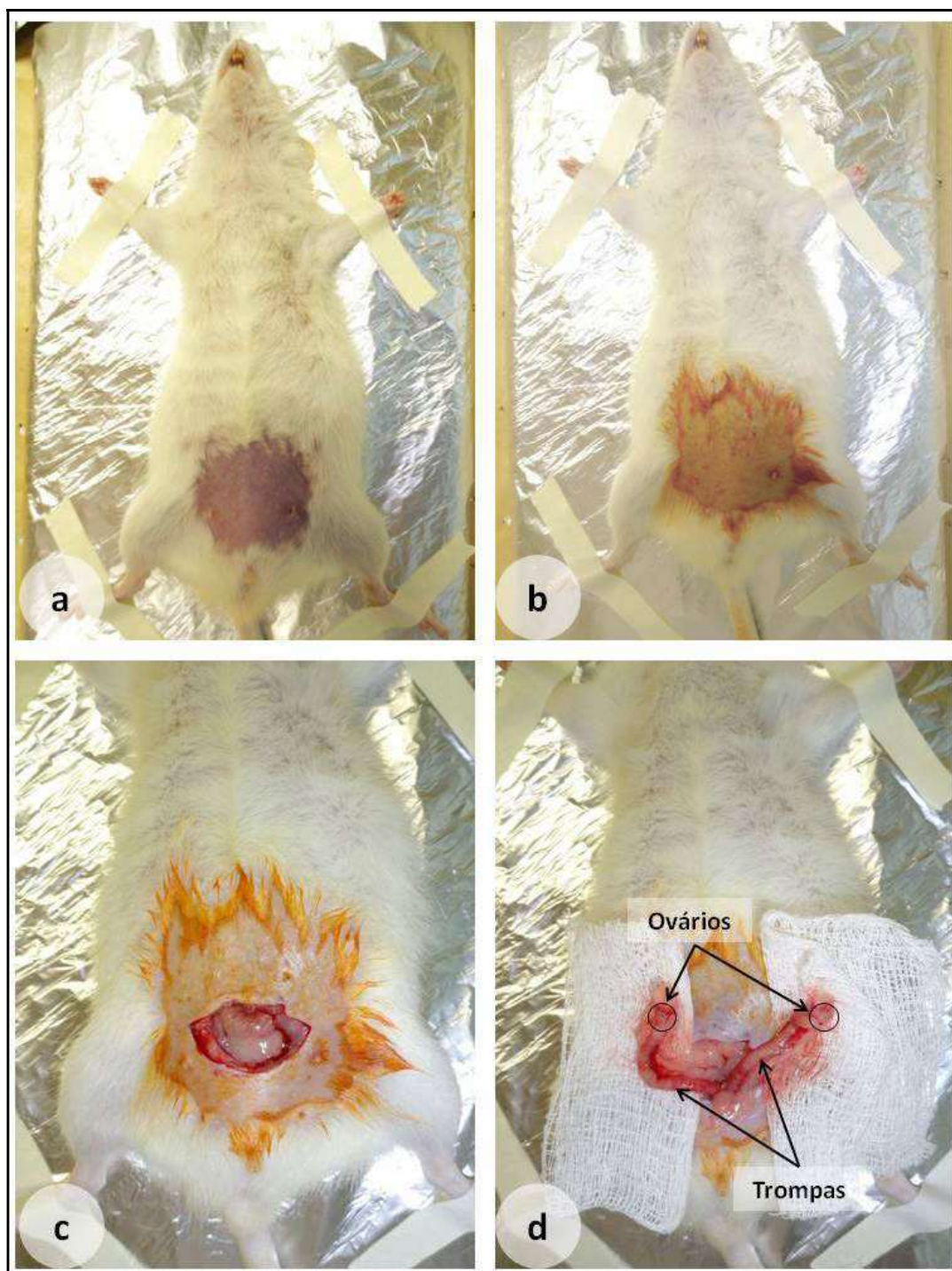


Figura 6. Ooforectomia bilateral

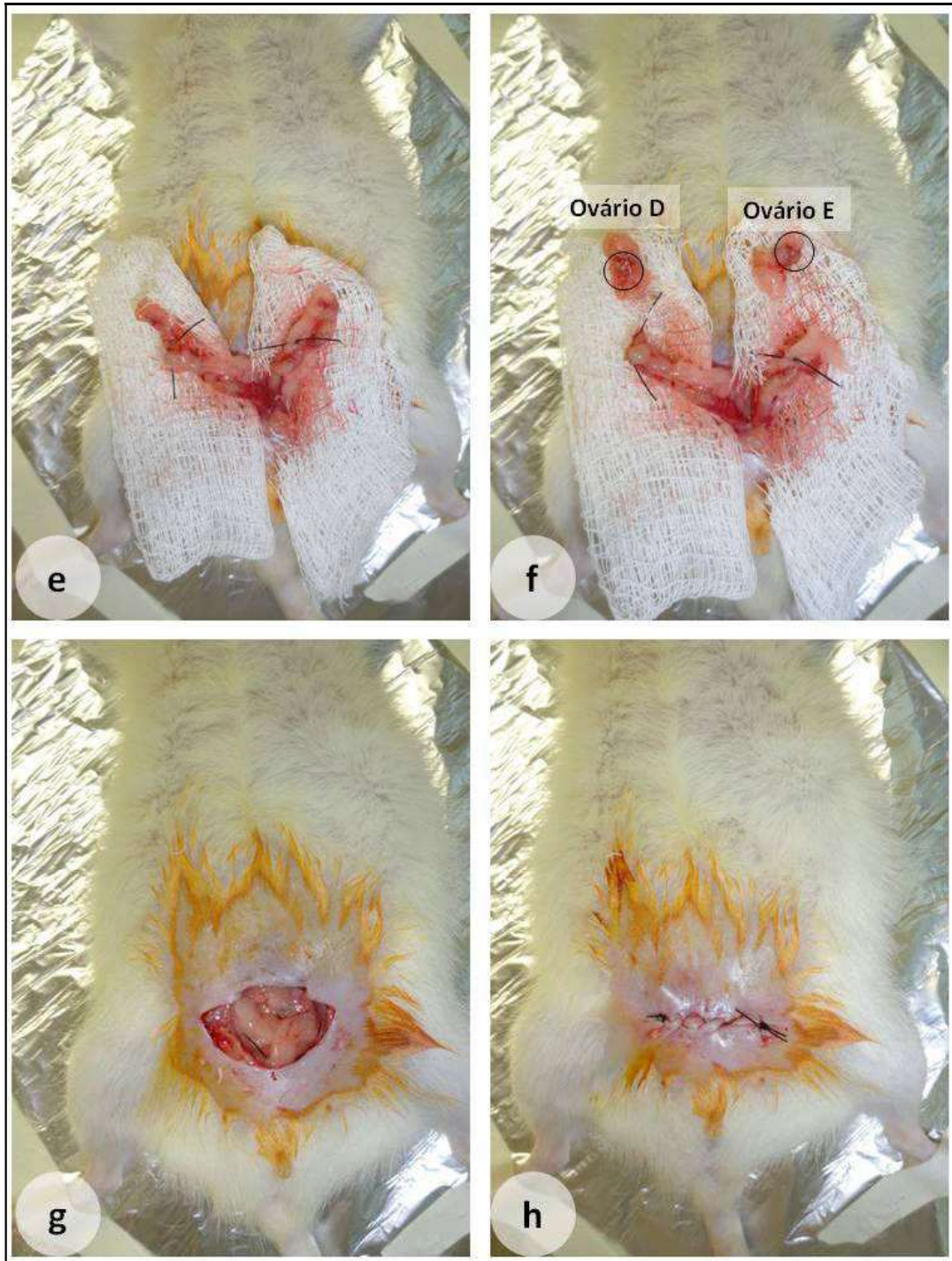


Figura 6. Ooforectomia bilateral (continuação)

(a): animal em decúbito ventral com tricotomia abdominal realizada; (b): assepsia local com PVPI; (c): incisão abdominal; (d): trompas uterinas e ovários exteriorizados com camada de tecido adiposo; (e): ligadura bilateral nas porções distais das trompas uterinas; (f): secção e remoção dos ovários bilateralmente; (g): trompas uterinas e tecido adiposo visceral recolocados na cavidade abdominal, e (h): sutura das camadas muscular e cutâneas abdominal em mononylon 2.0 com agulha circular 3.

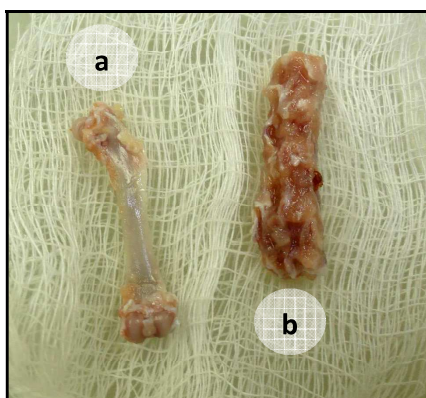
APÊNDICE II – Ossos dissecados dos animais da pesquisa

Figura 7. Fêmur direito (a) e coluna lombar de rata (b)

APÊNDICE III – Aquisição de imagens por densitometria óssea realizada no Hospital Dom Vicente Scherer



Figura 8. Densitômetro LUNAR DPX, GE®

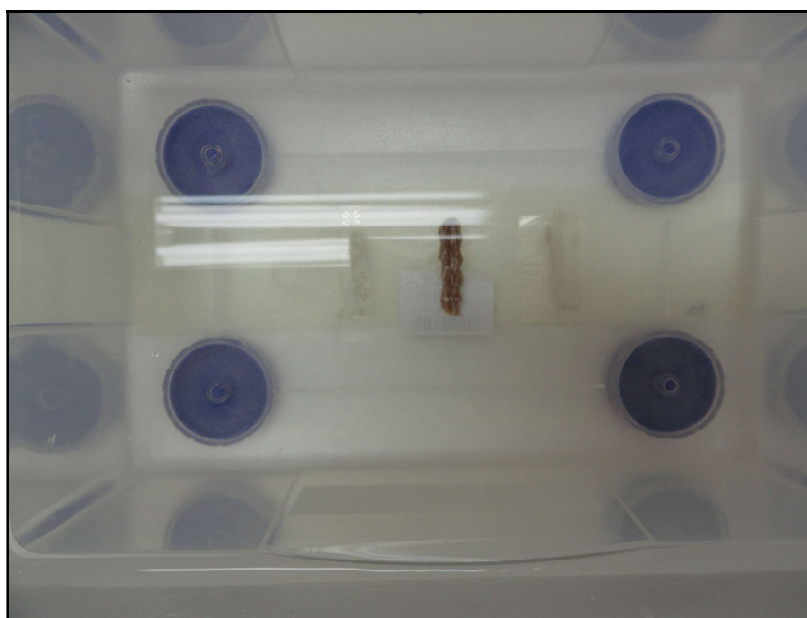


Figura 9. Ossos (L1-L4) em análise no densitômetro

APÊNDICE IV – Aquisição de imagens por tomografia computadorizada quantitativa realizada no Hospital Dom Vicente Scherer



Figura 10. Aquisição das imagens dos ossos por tomografia

APÊNDICE V – Imagens de tomografia computadorizada quantitativa em análise na estação de trabalho

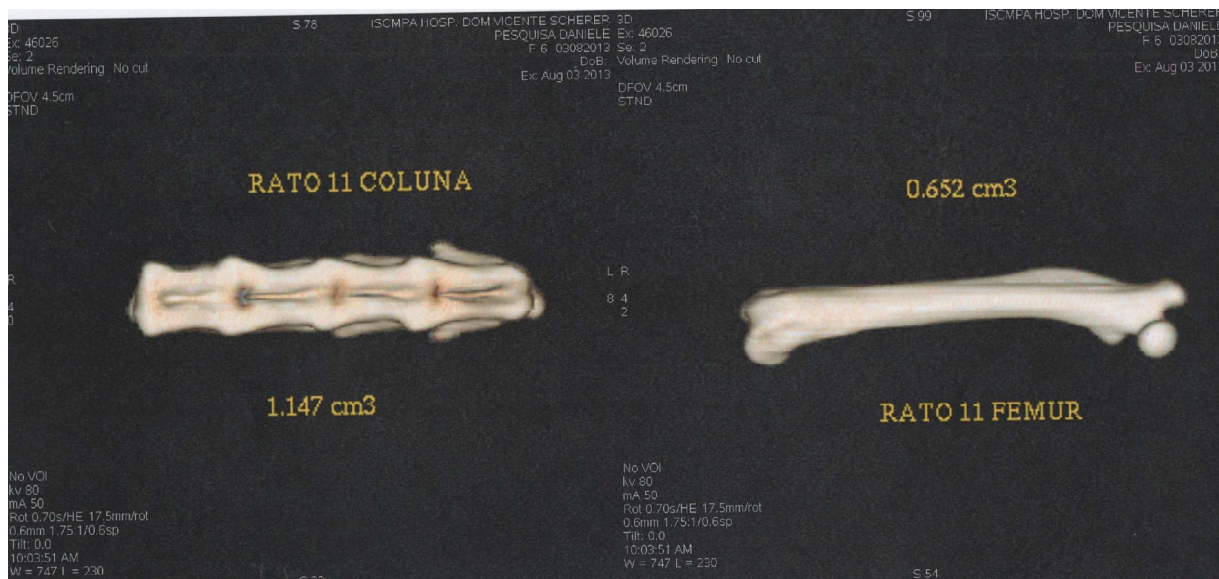


Figura 11. Imagem volumétrica gerada na estação de trabalho a partir da aquisição na TCQ



Figura 12. Imagem de fêmur com espessura de 0,6mm para mensuração de densidade nas regiões de interesse a partir de aquisição por TCQ